

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI UDINE

Dottorato di Ricerca in Scienze e Biotecnologie Agrarie
Ciclo XXIV

Coordinatore: Prof. Mauro Spanghero

Tesi di Dottorato di Ricerca

Studio dei meccanismi cellulari e molecolari
di risposta a composti nutraceutici
negli animali

Supervisore:

Prof. BRUNO STEFANON

Dottoranda:

Dott.ssa CHIARA SCAINI

ANNO ACCADEMICO 2010/2011

Indice

Summary	iii
1 Introduzione	1
1.1 Nutrigenomica e Nutrigenetica	1
1.2 I nutraceutici: classificazione botanica e i fitocomplessi . .	4
1.3 I composti d'interesse	7
1.3.1 Curcuma longa	7
1.3.2 Echinacea angustifolia	12
1.4 Loop neuro-endocrino-immunitario: i processi infiammatori	14
1.5 L'infiammazione	15
1.5.1 Infiammazione acuta	16
1.5.2 L'infiammazione cronica e l'invecchiamento	16
1.5.3 Il sistema immunitario	17
1.5.4 Le cellule del sistema immunitario	19
1.5.5 Le citochine	22
1.5.6 Le chemochine	23
1.6 Modelli sperimentali	25
1.6.1 Il modello cellulare	25
1.6.2 Il modello animale	28
1.7 La tecnologia del DNA microarray	29
2 Scopo	33
3 Materiali e metodi	34
3.1 Caratteristiche degli estratti	34
3.2 Modulazione dell'attività di neutrofili ovini <i>in vitro</i>	34
3.2.1 Isolamento di neutrofili da sangue ovino	34
3.2.2 Test cellulari: MTT, ADH, SOD	37
3.2.3 Analisi statistica dei dati	39
3.3 Linee cellulari stabilizzate	39
3.3.1 Test molecolari: real-time PCR	41

3.3.2	Estrazione di RNA da callule RAW 264.7	41
3.3.3	Trattamento con DNasi	43
3.3.4	Retrotrascrizione	43
3.3.5	Primer design	44
3.4	Test <i>in vivo</i>	44
3.4.1	Prova di alimentazione su cani sani	44
3.4.2	Prova di trattamento su cani affetti da osteoartrite	46
3.4.3	Estrazione dell'RNA da sangue intero di cane . . .	48
3.4.4	Analisi statistica dei dati	50
3.4.5	qRT-PCR analysis	50
4	Risultati e discussione	52
4.1	Prove <i>in vitro</i>	52
4.1.1	Tossicità cellulare	52
4.1.2	Test di funzionalità	53
4.1.3	RAW 264.7	58
4.2	Prove <i>in vivo</i>	64
4.2.1	Prova alimentare su cani sani	64
4.2.2	Prova di trattamento di cani affetti da osteoartrite	71
	Conclusioni	89
	Bibliografia	91

Summary

Nutrition research, until recent years, has been focused on nutrient deficiencies and impairment of health. With the advent of genomics and the application of the knowledge on functional genomics, integrated by transcriptomics, metabolomics and proteomics, new opportunities have emerged for increasing our understanding on how nutrients can modulate gene and protein expressions and influence cell metabolism.

The aim of my study was to analyze the effects at cellular and molecular level, that natural bioactive nutraceuticals could have when used as supplement in companion animal nutrition. Particular interest is directed toward functional foods that can provide, in addition to basic nutrients, also bioactive compounds of natural origin with immunostimulant and immunomodulatory properties, to be used for the health care and the treatment of inflammatory conditions.

In this context, on the basis of the previous experience of the research group and on the basis of existing scientific literature, we chose to study the properties of bioactive extracts of *Curcuma longa* and *Echinacea angustifolia*, which are viewed promising compounds of plant origin for the treatment of inflammatory conditions.

To achieve this goal an experimental plan has been structured, split in a preliminary *in vitro* experimental assay and a second *in vivo* study. After an *in vitro* toxicological screening of the extracts, two functionality tests on PMA-stimulated neutrophils were performed. Neutrophils represented a suitable cellular model to evaluate basic functional parameters related to inflammation, because blood polymorphonuclear cells are one of the major cellular components of the innate immune system. This preliminary analysis showed that *Curcuma longa* extract causes a significant decrease in cell adhesion, as regards the production of superoxide ions. However, it was observed that the extract at low concentrations inhibits the inflammatory response, but at high concentrations leads to an increased production of superoxide ions. The parameters analyzed were not significantly modulated from *Polinacea angustifolia* extract.

In vitro analysis continued on the cell line RAW 264.7 (Mouse leukaemic monocyte macrophage cell line), because macrophages play an important role in the immune response and during inflammatory diseases. Macrophages treatment enabled us to evaluate the modulation of gene expression of IL-1 β , NF- κ B and TNF- α after the treatments with the extracts of Curcuma longa (Curcumin) and Echinacea angustifolia (Polinacea). The results obtained in this trial have shown that both Curcumin and Polinacea treatment lead to a decrease in gene expressions of target genes related to the macrophages-mediated immunity. This trend suggested that Curcumin and Polinacea extracts possess anti-inflammatory properties, which are involved in the regulation of immune response and defense-related genes that have key roles in various inflammatory processes.

The first *in vivo* testing consisted in a dietary intervention study, carried out on healthy dogs and developed in a period of 60 days. It was set up to evaluate the effect of extract-supplemented diets on the expression of specific genes related to inflammation. This trial also helped us to evaluate the tolerability of nutraceutical compounds, through quantification of liver and kidney clinical biomarkers in plasma (AST, ALT, gGT). The analysis of these parameters contributed to the emergence of an important aspect derived from this study, that is lack of toxicity of the products. The results of gene expression confirmed a good anti-inflammatory activity of the extracts, which mainly appeared in the down regulation of IL8, a pro-inflammatory cytokine. An interesting aspect revealed in this work relates to the Polinacea anti-inflammatory potential, which definitely deserves a close examination on its potentiality *in vivo*.

The second *in vivo* study was carried out in osteoarthritic affected dogs, considering that OA represents a good model of spontaneous chronic inflammation and offers an opportunity to screen the effects of curcuminoids in a real situation. This study analyzed the full transcriptome of dog and showed that curcumin regulates the molecular targets of the inflammatory response as observed in humans. Definitive conclusions regarding the remission of disease's symptoms can not be done, considering the low number of dogs used in the study, and further clinical studies are required, but Curcumin showed an antinflammatory activity close to that observed for NSAIDs.

In conclusion, the study of the natural compounds properties at molecular and cellular level has the potential to help us to identify targets of pharmacological interest, to assess the global activity of nutraceuticals and open the way for the identification of most significant biomarkers in the modulation of the inflammatory process.

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Nutrigenomica e Nutrigenetica

L'avvento della genomica funzionale, volta a scoprire le funzioni dei singoli geni e le loro interazioni, integrata con la trascrittomica, proteomica e metabolomica, ha permesso di aumentare la nostra conoscenza di come i nutrienti possono modulare l'espressione genica e proteica e influenzare il metabolismo cellulare (Izar MCO, 2007).

Nel caso di studi epidemiologici e clinici di nutrizione, la conoscenza del background genetico della popolazione in esame è fondamentale. In assenza di queste informazioni c'è il pericolo di giungere a raccomandazioni farmacologiche e a raccomandazioni alimentari non corrette.

Per superare questi problemi e comprendere meglio la relazione tra i geni e l'alimentazione, il campo della nutrizione ha cominciato a sfruttare sia le tecnologie, che i software analitici di supporto sviluppati nell'era post-genomica. Sono nate così la nutrigenomica e la nutrigenetica, due discipline con un diverso approccio per spiegare l'interazione tra dieta e geni, ma con il comune obiettivo di migliorare lo stato di salute attraverso la personalizzazione della dieta, e che forniscono approcci convincenti per comprendere la relazione complessa tra molecole nutritive, polimorfismi genetici e sistema biologico nel suo insieme (Mutch DM, 2005).

La nutrigenomica ha l'obiettivo di capire l'influenza dei comuni ingredienti della dieta sull'espressione genica, più precisamente di come i nutrienti influiscono sulle vie metaboliche e il controllo omeostatico. Le basi concettuali di questa nuova branca di ricerca genomica possono essere sintetizzate in cinque punti:

- le comuni sostanze alimentari che agiscono direttamente o indiret-

tamente sul genoma possono alterare la struttura o l'espressione genica;

- l'alimentazione può costituire un fattore di rischio per alcuni individui in particolari circostanze;
- alcuni geni regolati dalla dieta, e le loro varianti, possono avere un ruolo nell'insorgenza, nella progressione e nella gravità della malattia;
- il makeup genetico di un individuo può influenzare il livello nel quale la dieta influisce sull'equilibrio tra lo stato di salute e di malattia;
- le raccomandazioni alimentari basate sulla conoscenza delle necessità nutrizionali, lo stato di nutrizione e il genotipo, chiamata alimentazione personalizzata, può essere usata per prevenire, alleviare o curare le malattie croniche (Izar MCO, 2007).

La nutrigenetica ha invece l'obiettivo di capire come il makeup genetico di un individuo coordina la sua risposta alla dieta, andando dunque a identificare e caratterizzare varianti geniche che determinano una differente risposta ai nutrienti, e relazionando queste variazioni allo stato di malattia.

Se la popolazione umana avesse genomi identici e visse in un ambiente non variabile, la risposta alla dieta sarebbe equivalente. Con il sequenziamento completo del genoma umano sono stati mappati 7.7 milioni di SNPs (single nucleotide polymorphisms), che sono responsabili delle variazioni individuali (Riva A et al., 2004).

E' già noto che la variazione genetica è importante per la risposta fisiologica a particolari nutrienti, e l'interesse in questo campo continua ad aumentare.

Sono stati identificati numerosi polimorfismi che aumentano il rischio di malattie cardiovascolari e diabete. Inoltre, l'analisi degli SNP fornisce un potente strumento molecolare per lo studio del ruolo della nutrizione per la salute e malattia, e prenderli in considerazione negli studi clinici, metabolici ed epidemiologici può contribuire sostanzialmente alla formulazione di diete ottimali.

Nella maggior parte dei casi, i disturbi cardiovascolari, diabete, cancro e altre malattie croniche sono dovute alla complessa interazione tra molti geni e fattori ambientali (Hirschhorn JN et al., 2002).

Oltre agli SNPs, che rappresentano la forma più comune di variazione di sequenza nel genoma umano, sembrano essere molto più diffuse di quanto ci si aspettasse anche le ripetizioni di tratti di sequenze di genoma (CNV: copy number variants), che possono costituire una buona fonte di variabilità

genetica che influenza la risposta alla dieta (Fenech et al, 2011). Alcune delle evidenze più solide derivano dall'osservazione che un aumento nel numero di copie del gene dell'amilasi (enzima responsabile dell'idrolisi dell'amido), è associato all'aumento dell'attività enzimatica e alla digestione dell'amido (Perry et al., 2007).

I componenti alimentari hanno proprietà bioattive in diversi tessuti e organi, con effetti sui pattern di espressione genica (trascrittoma), sull'organizzazione della cromatina (epigenoma), sui pattern d'espressione proteica, incluse le modificazioni post-trascrizionali (proteoma) e i profili metabolici (metaboloma).

Perciò, l'espressione dell'informazione genetica può essere altamente dipendente da, e regolata da, nutrienti, micronutrienti e sostanze fitochimiche che si trovano negli alimenti (Kaput, 2005).

Oltre ai nutrienti essenziali, come i carboidrati, aminoacidi, acidi grassi, calcio, zinco, selenio, folato, e vitamina A, C ed E, c'è una varietà di componenti bioattivi non essenziali che sembrano influenzare significativamente la salute (Corthésy-Theulaz et al 2005). A livello cellulare i nutrienti possono:

- agire direttamente come ligandi su fattori di trascrizione;
- essere metabolizzati da vie metaboliche primarie o secondarie, di conseguenza alterando le concentrazioni dei substrati o degli intermedi coinvolti nella regolazione genica o nel signalling cellulare;
- alterare le vie di trasduzione del segnale e il signaling.

Storicamente, i prodotti naturali hanno fornito un'inesauribile risorsa in medicina, e nonostante la diversificazione delle tecnologie per la ricerca di farmaci e le ridotte sovvenzioni per la ricerca di farmaci basati su prodotti naturali, i derivati da piante e da altre risorse biologiche rimangono una fonte molto importante per la formulazione di nuovi farmaci.

I principi della nutrigenetica seguono naturalmente quelli della farmacogenetica come illustrato in figura 1.1 (Gillies PJ, 2003). La farmacogenetica è lo studio delle basi genetiche della risposta farmacologica, la farmacogenomica invece studia la variabilità interindividuale nella risposta ai farmaci.

Così come la farmacogenetica cerca di adattare i farmaci alla costituzione genetica del paziente, basandosi sulle variazioni nei geni del metabolismo dell'ospite, accoppiate con le variazioni genetiche dei target del

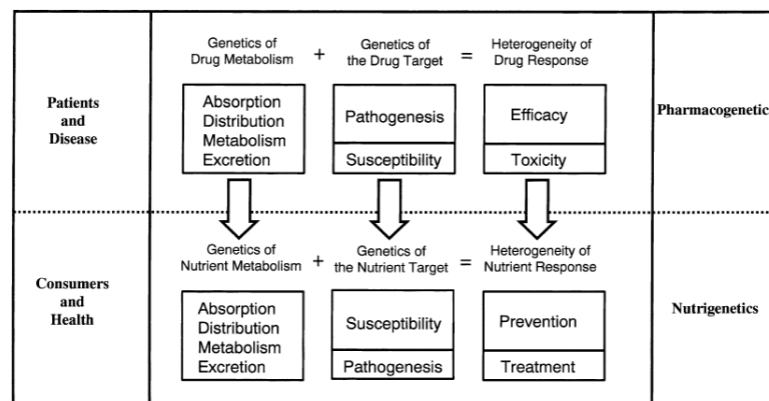


Figura 1.1: Farmacogenetica vs nutrigenetica. Tratto da Gillies PJ, 2003.

farmaco; la nutrigenetica offre la prospettiva di una dieta personalizzata sulla base delle caratteristiche genetiche del consumatore basate sulla conoscenza delle variazioni nei geni che partecipano alla metabolizzazione del dato nutriente, e sulle variazioni genetiche dei target del nutriente.

Sebbene entrambi i campi siano allo stadio iniziale, c'è un numero di nuovi farmaci e di molecole nutrizionali bioattive che validano i principi presentati in figura e fanno intravedere delle opportunità per il futuro.

E' molto importante comunque instaurare un dialogo tra i campi della farmacogenetica e nutrigenetica, perchè non sempre i geni importanti per un risultato clinico sono direttamente coinvolti nella patogenesi della malattia o nei benefici nutrizionali.

Per la farmacogenomica un composto ha un sito d'azione esclusivo (il paradigma: "one drug one target"), mentre in nutrigenomica c'è una moltitudine di nutrienti e molecole chimiche, ciascuna capace di regolare molti processi biologici. Perciò l'approccio non può essere simile a quello utilizzato dalle compagnie farmaceutiche. Inoltre, l'esposizione agli alimenti si ha durante tutta la vita, e questo aumenta la sua importanza nel metabolismo cellulare, nel mantenimento dell'equilibrio salute-malattia e nel processo di invecchiamento (Roberts MA et al., 2001).

1.2 I nutraceutici: classificazione botanica e i fitocomplessi

Il termine nutraceutico, coniato 1989 da Stefano De Felice, deriva dalla fusione di nutrizione e farmaceutico e sta a indicare un alimento, o prodot-

to alimentare salutare, che associa a componenti nutrizionali le proprietà curative di principi attivi naturali estratti da piante (Kalra EK, 2003).

Questi alimenti vengono anche detti alimenti funzionali, “pharma food” o farmalimenti. Le piante producono infatti numerosi composti organici che non sembrano avere una funzione diretta sulla propria crescita e sul proprio sviluppo, e queste sostanze sono conosciute come metaboliti secondari, composti secondari o prodotti naturali.

A differenza dei metaboliti primari, come la clorofilla, gli amminoacidi, i nucleotidi o i carboidrati semplici, i prodotti secondari non hanno ruoli generalmente riconosciuti nei processi di fotosintesi, respirazione, trasporto di soluti, traslocazione, assimilazione di nutrienti e differenziamento.

I prodotti secondari differiscono anche dai metaboliti primari per avere una distribuzione ristretta nel regno vegetale. Particolari prodotti secondari si trovano tipicamente solo in una specie vegetale o in un gruppo di specie tassonomicamente imparentate, mentre i metaboliti primari di base si trovano in tutto il regno vegetale.

I metaboliti secondari vegetali possono essere suddivisi in tre gruppi a seconda della loro via di biosintesi: terpeni, composti fenolici e composti contenenti azoto.

I terpeni sono lipidi sintetizzati a partire dall’acetil CoA o da intermedi della glicolisi. Sono costituiti da unità isopreniche a 5 atomi di carbonio, sono delle tossine e dei deterrenti per l’alimentazione degli erbivori.

I composti fenolici sono sostanze aromatiche che si formano in diversi modi, attraverso la via dell’acido malonico e principalmente la via dell’acido scichimico e rivestono numerosi importanti ruoli nella pianta. I tannini, la lignina, i flavonoidi e alcuni composti fenolici semplici servono da difesa contro gli erbivori e i patogeni. La lignina rafforza anche meccanicamente le pareti cellulari mentre numerosi pigmenti flavonoidi sono importanti agenti attrattivi per l’impollinazione e la disseminazione. Alcuni composti fenolici semplici influiscono sulla crescita delle piante limitrofe e quindi hanno attività allelopatica.

Appartengono al terzo gruppo i metaboliti secondari contenenti azoto, come gli alcaloidi, i glucosidi cianogenetici, i glucosinolati, gli amminoacidi non proteici e gli inibitori di proteinasi, che proteggono la pianta da una gran quantità di animali erbivori. Questi metaboliti sono biosintetizzati principalmente a partire da amminoacidi.

Lo studio dei metaboliti secondari delle piante ha molte applicazioni pratiche. Per la loro attività biologica contro gli animali erbivori ed i microbi, molte di queste sostanze sono impiegate come insetticidi, fungicidi e prodotti farmaceutici, mentre altre trovano applicazione come profumi, aromi,

droghe medicinali e materie prime per l'industria (Taiz L, Zeiger E, 2001).

In molti paesi orientali, per migliaia di anni, sono stati usati i tradizionali medicinali di origine vegetale e i loro preparati per mantenere un buono stato di salute e curare le malattie. Negli ultimi anni essi hanno attirato l'attenzione anche dei ricercatori dei paesi occidentali, per la loro efficacia farmacologica unita a ridotti effetti collaterali. Tuttavia, i composti derivati da piante non sono ancora stati riconosciuti in tutto il mondo poiché i dati qualitativi e quantitativi sulla loro sicurezza ed efficacia non sono sufficienti a soddisfare i criteri generali dei medicinali, così come definiti nelle "General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicines".

E' noto che l'effetto terapeutico di un estratto vegetale si basa sull'effetto sinergico dei suoi costituenti, e cioè dell'insieme di tutte le sostanze presenti nella parte di pianta utilizzata come medicamento, complessivamente responsabili dell'azione terapeutica specifica della pianta, detto fitocomplesso. Nel fitocomplesso oltre al principio attivo sono presenti anche sostanze inerti e sostanze regolatrici dell'attività farmacologica. Rispetto al singolo principio attivo, il fitocomplesso ha una composizione molto più articolata, e questo può essere considerato il motivo principale per il quale il controllo qualità sugli estratti vegetali è più difficile rispetto a quello applicato alla medicina occidentale.

Tra i composti bioattivi derivati da piante, ne sono stati identificati alcuni con proprietà antinfiammatorie; probabilmente il composto più comune e meglio conosciuto è il salicilato, un farmaco antinfiammatorio non steroideo (FANS). E' stato provato che molte altre piante possiedono attività antinfiammatoria, come il Turmerico, *Achillea setacea*, *Aloe vera*, *Eucalypto globulus*, *Gaultheria procumbens*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* e *Urtica Sp* (Franz et al., 2005). I dati si riferiscono soprattutto alla farmacocinetica e a studi clinici, ma sono disponibili poche informazioni riguardanti i loro meccanismi d'azione molecolari e cellulari. L'approfondimento delle proprietà dei composti naturali a livello molecolare e cellulare, potrebbe permettere di individuare i target farmacologici dei fitocomplessi d'interesse, di valutarne l'attività globale ed aprire una strada per l'identificazione dei biomarker più significativi nella modulazione del processo infiammatorio.

1.3 I composti d'interesse

1.3.1 *Curcuma longa*

La *Curcuma longa* o Turmerico è una pianta erbacea, perenne, rizomatosa della famiglia delle Zingiberacee, originaria dell'Asia sud-orientale e largamente impiegata come spezia.

Dal rizoma si ricava la curcumina, isolata per la prima volta nel 1815 da Vogel e Pellettier.

Si tratta di un polifenolo, conosciuto anche con il nome di diferuloilmetano, la cui struttura, identificata nel 1910 da J. Milobedzka e V. Lampe (Germania), è sotto riportata (1.2).

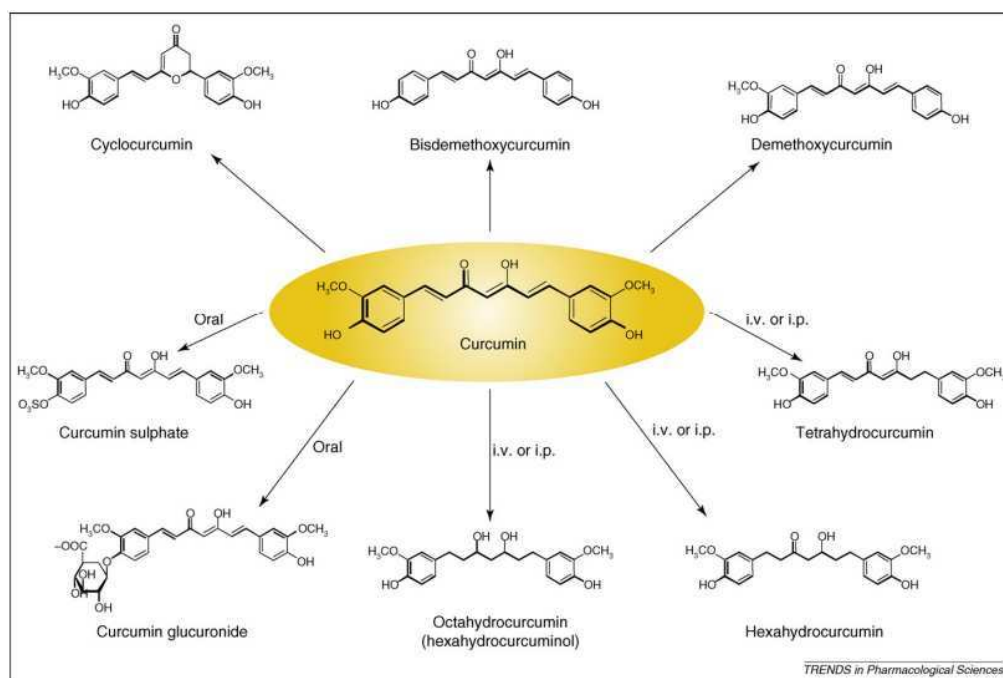


Figura 1.2: Struttura della curcumina, i suoi analoghi naturali e i suoi più importanti metaboliti. Tratto da Bharat B. et al., 2008.

Chimicamente, anche se la curcumina è il diferuloilmetano [1,7-bis(4-idrossi-3-metossifenil)-1,6-eptadiene-3, 5 dione], la curcumina disponibile commercialmente può contenere anche circa il 17% circa e il 3% di demetossicurcumina (DMC) e bisdemetossicurcumina (BDMC) rispettivamente. Ad ogni modo è stato dimostrato che la Curcumina è più attiva della DMC e della BDMC (Sandur SK et al., 2007).

I target molecolari

Negli anni sono stati identificati uno straordinario numero di target molecolari riportati in Figura 1.3. Questi target appartengono a due categorie: quelli ai quali la curcuma si lega direttamente modulandone l'attività, e quelli per i quali la modulazione è indiretta o secondaria.

Growth Factors		EGF, NGE, FGF, TGF β , HGF, PDGF, VEGF
Transcription factors		AP-1, NF κ B, STAT1, 3, 4, 5, HIF-1 α , CBP, β -catenin, ATF-3, CHOP, SP-1, PPAR- γ , NrF2, p53
Protein kinases		PKA, PKB, PKC, Src, FAK, ERK, JNK, JAK, MAPK
Other enzymes		Glutathione reductase, GST, ATPase, p300 histone acetyl transferase, telomerase, iNOS, HO-1, MMP-9, HDAC 1, 3, 8
Mediators of inflammation		TNF, IL-1, 2,5,6, 8, 12, COX-2, 5-LOX, PSA, CRP
Apoptotic proteins	Anti-apoptotic proteins	cFLIP, IAP, XIAP, Bcl-2, Bcl-xL, survivin
	Pro-apoptotic proteins	Bax, Bid, caspase 3 and 8
Cell-cycle regulatory proteins		Cyclin D1, cyclin E, c-myc, p-21
Others		DFF40, Hsp70, DNA topoisomerase-II, MDR1, HIV-1 integrase

Figura 1.3: Target molecolari della curcumina. Tratto da Sikora E et al., 2010.

Questi target includono fattori di trascrizione come AP-1, NF κ B, SP-1, p53, fattori di crescita e i loro recettori come HER2 ed EGFR, enzimi come le protein chinasi (PKA, PKC, FAK, Src), il glutathione S-transferasi, la DNA topoisomerasi-II, la telomerasi, l'eme-ossigenasi-1, metalloproteinasi, lipossigenasi (5-LOX), ciclossigenasi-2 (COX-2), alcune chemochine e interleuchine (IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α). Inoltre la curcuma è un inibitore della proliferazione avendo come target anche proteine che regolano il ciclo cellulare, ed è un potente induttore della morte cellulare (Sikora E et al., 2010).

Le conseguenze fisiologiche più importanti sembrano derivare dall'azione della curcumina come inibitore dell'attività del fattore di trascrizione NF κ B.

Per la sua capacità di indurre la morte cellulare, la curcumina ha acquisito molto interesse per un suo utilizzo come agente chemopreventivo e anticancro, proprietà che è già stata confermata in molti esperimenti *in vitro* e in studi preclinici su animali modello.

Molte attività della curcumina sono correlate con la sua capacità di sopprimere l'infiammazione acuta e cronica, tramite lo scavenging delle specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto, l'inibizione delle vie di risposta allo stress ossidativo che portano all'attivazione dei fattori di trascrizione AP-1

e NF κ B2, e tramite l'inibizione della via di segnalazione dell'NF κ B (Sikora E et al., 2010).

NF κ B è una famiglia di fattori di trascrizione ubiquitariamente espressi. Nei mammiferi appartengono alla famiglia NF κ B/Rel cinque membri: p50 (NF κ B1), p52 (NF κ B2), p65 (RelA), c-Rel e RelB. La forma più abbondante di NF κ B è l'eterodimero costituito da p50 e p65.

Nelle cellule non stimolate, l'NF κ B si trova sequestrato nel citoplasma in una forma inattiva grazie alla sua interazione con le proteine inibitorie I κ B (I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ). Nella via di attivazione canonica, rappresentata in Figura 1.4, subito dopo la stimolazione delle cellule con uno stress ossidativo, danno al DNA o con la citochina pro-infiammatoria TNF- α , I κ B α viene fosforilato su due specifici residui di serina da parte di un complesso chinasi (IKK). La fosforilazione rappresenta un segnale per la poliubiquitinazione.

La degradazione di I κ B α operata dal proteasoma porta a una rapida traslocazione di NF κ B al nucleo, dove attiva la trascrizione di una grande varietà di promotori, incluso quello del suo stesso inibitore I κ B α . L'I κ B α appena sintetizzato entra nel nucleo e rimuove NF κ B dai suoi siti di legame al DNA e lo trasporta di nuovo al citoplasma, terminando così la trascrizione NF κ B-dipendente (Chung HY et al, 2009; Hayden MS et al., 2004; Quivy V et al, 2004) .

Ad ogni modo la regolazione dell'attività di NF κ B non si limita alla fosforilazione dell'inibitore I κ B α , ma dipende anche dalla diretta acetilazione/deacetilazione del dimero nucleare di NF κ B dal momento che l'acetilazione degli istoni porta alla perdita della struttura della cromatina e permette l'accesso al DNA ai fattori di trascrizione. In accordo con il loro ruolo nel cambiare la struttura della cromatina, molti coattivatori trascrizionali hanno un'attività intrinseca di istone acetiltransferasi (HAT), e complessi corepressori includono proteine con attività istone deacetilasi (HDAC). E' stato documentato che la trascrizione NF κ B-dipendente richiede coattivatori che possiedano l'attività HAT come ad esempio p300/CBP. In esperimenti che hanno utilizzato inibitori di HDAC, è stato messo in luce che l'attivazione trascrizionale di NF κ B può essere regolata dall'acetilazione diretta di p50 e p65 (Quivy V et al, 2004). Il fattore di trascrizione NF κ B è il master regulator del processo infiammatorio, e attiva l'espressione di molte citochine pro-infiammatorie, come il TNF- α , IL-1 β e IL-6. Alcune delle proteine indotte da NF κ B, come il TNF- α , sono anche i suoi attivatori, condizione particolarmente importante nello stato infiammatorio cronico. TNF- α sembra essere il principale responsabile dell'inflammaging, poiché

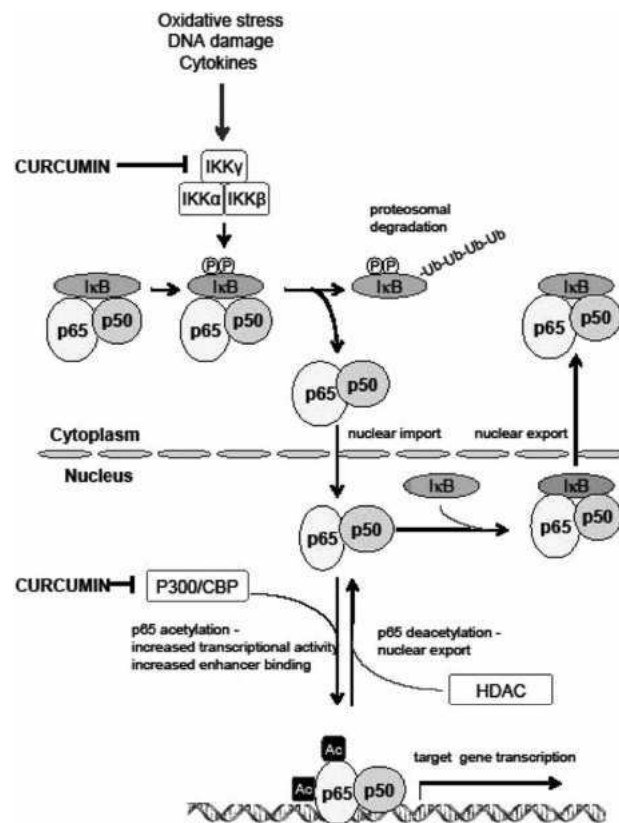


Figura 1.4: Via di segnalazione dell'NF-κB. Tratto da Sikora E et al., 2010.

questo sistema di segnale integra la regolazione intracellulare della risposta immunitaria sia nell'invecchiamento che con le malattie correlate con l'invecchiamento (Salminen A et al., 2008).

Uso terapeutico

La curcumina è stata utilizzata per millenni nella medicina tradizionale indiana e cinese come agente cicatrizzante e per trattare molteplici malattie, come i comuni raffreddori, la tosse, stati infiammatori. Le sue proprietà anti-infiammatorie e anti-ossidanti, la rendono particolarmente interessante nella terapia di molte malattie con componenti infiammatori, come il cancro, le malattie cardiovascolari, l'Alzheimer, l'artite reumatoide e la sindrome metabolica (Sikora et al., 2010). Ad oggi sono molte le malattie per le quali si sono ottenuti buoni risultati con l'utilizzo di tale estratto: sclerosi multipla, morbo di Alzheimer, artrite, disturbi cardiovascolari, diabete, allergie, asma e infiammazioni del sistema digerente.

In particolar modo, la curcumina sopprime l'infiammazione acuta e ne previene il suo cronicizzarsi, e questo avviene mediante la regolazione dei fattori di trascrizione infiammatori (come il fattore nucleare $\text{NF}\kappa\text{B}$), di enzimi come la cicloossigenasi 2 (COX) o le lipossigenasi (LOX) e attraverso l'inibizione della produzione di citochine pro-infiammatorie da parte di macrofagi e monociti (Bharat B et al., 2008).

Limiti

Nonostante sia stato dimostrato che la curcumina modula molti target che sono stati correlati con il cancro e con altre malattie croniche, uno dei limiti più importanti è la sua biodisponibilità (Anand P et al., 2007). Studi condotti sia sugli animali che sull'uomo, hanno mostrato che la curcumina somministrata oralmente è scarsamente biodisponibile. La curcumina sembra essere metabolizzata attraverso la coniugazione e la riduzione (Ireson CR et al., 2002). Quando somministrata oralmente la curcumina subisce una coniugazione, che porta alla formazione di curcumina glucuronide e curcumina solfato nell'intestino e nel fegato; la curcumina somministrata intraperitonealmente o sistemicamente subisce una riduzione che porta alla formazione di tetraidrocurcumina, esaidrocurcumina e octaidrocurcumina. Sia i metaboliti di coniugazione che di riduzione della curcumina, sono biologicamente inattivi (Sandur SK et al., 2007). La scarsa biodisponibilità della curcumina è dovuta alla natura idrofobica della molecola e numerosi approcci sono stati intrapresi per aumentarne la biodisponibilità. Questi approcci comprendono l'uso di adiuvanti come la piperina che interferisce con la glucuronidazione, l'uso del liposoma, di nanoparticelle, l'uso del complesso curcumina fosfolipide e l'uso degli analoghi strutturali della curcumina. Poiché la maggior parte degli effetti terapeutici della curcumina si basa sugli studi condotti su colture cellulari e su animali modello, sono necessarie più prove cliniche per comprendere interamente il potenziale della curcumina.

L'estratto utilizzato nello studio è un estratto brevettato (Meriva - Bioavailable Curcumin, Indena) che ha un contenuto totale in curcumina del 20%. La curcumina commerciale è una miscela di tre curcuminoidi: curcumina monomolecolare, dimetossicurcumina e bidimetossicurcumina a un rapporto di 75:15:10 circa.

Come già discusso precedentemente, la curcumina è un composto polifenolico con bassa biodisponibilità, che può essere incrementata utilizzando l'estratto come fitosoma.

La tecnologia del fitosoma contribuisce ad aumentare la capacità della curcumina di attraversare le membrane biologiche, sostanzialmente questa struttura prevede che la curcumina sia incorporata in un ambiente lipofilo e in questo modo risulti protetta dalla degradazione operata dall'acqua e, allo stesso tempo, il rapido scambio di fosfolipidi tra le membrane biologiche e i fluidi extracellulari la possa veicolare all'interno delle membrane, aumentando il suo assorbimento cellulare.

In acqua, un fitosoma assume una forma a micelle, generando una struttura simile a un liposoma. Vi è però una fondamentale differenza tra un fitosoma ed un liposoma: nei liposomi, le particelle attive sono dissolte nella parte centrale della cavità, senza possibilità di interazione molecolari fra i lipidi circostanti e la sostanza idrofilica.

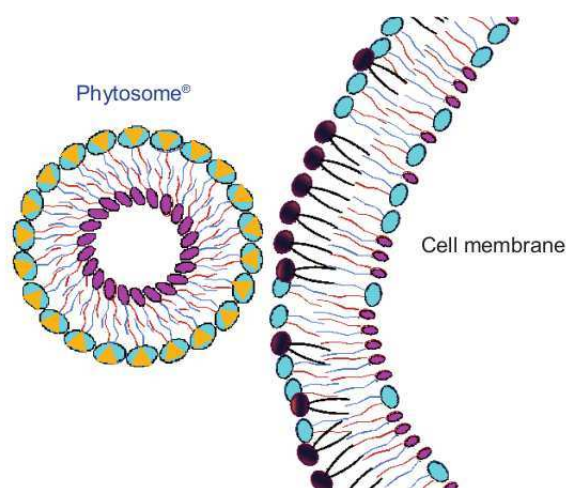


Figura 1.5: Rappresentazione di un fitosoma che si avvicina alla membrana cellulare (Indena Spa). L'affinità delle due strutture permette il trasporto dei principi attivi all'interno della membrana cellulare.

Al contrario, il complesso del fitosoma può essere comparato ad un parte integrante della membrana lipidica, dove le funzionalità polari dell'ospite lipofilo interagiscono attraverso legami ad idrogeno con le teste polari del fosfolipide (Semalty A. et al. 2009).

1.3.2 Echinacea angustifolia

L'Echinacea angustifolia è una pianta erbacea perenne originaria dell'America del nord e appartenente alla famiglia delle Compositae. Il genere *Echinacea* comprende nove specie delle quali solo l'*E. pallida*, l'*E. angusti-*

folia e l'*E. purpurea* hanno proprietà farmacologiche.

Veniva utilizzata dagli indigeni come rimedio naturale contro i morsi di serpente, tosse e, in generale, contro le infezioni (Morazzoni P. et al, 2005). Nel XX secolo ha continuato ad essere utilizzata specificatamente come rimedio contro raffreddore e influenza prima dell'avvento degli antibiotici moderni (Kligler B, 2003).

L'echinacoside è il componente fenolico più abbondante in *Echinacea angustifolia*, ed è noto per le sue proprietà antiossidanti, antinfiammatorie e cicatrizzanti (Pellati et al. 2003). È stato osservato che i componenti attivi dell'echinacea mostrano *in vitro* effetti protettivi sul tessuto connettivo della pelle, proteggendo il collagene dai danni causati dai radicali superossido e idrossilici (Facino RM et al., 1995.) Gli alchilammidi sono i principali costituenti lipofili che si trovano ad alte concentrazioni nella radice, e posseggono effetti stimolatori sulla fagocitosi; in particolar modo, agiscono su macrofagi e neutrofili, modulando la produzione di citochine pro-infiammatorie.

È stata inoltre studiata *in vitro* l'inibizione che questi componenti svolgono sull'attività della lipossigenasi-5 e della ciclossigenasi, suggerendo un loro effetto anti-infiammatorio (Muller-Jakic B et al., 1994).

L'Echinacea è meglio nota come immunostimolante. Diversi studi su condotti su topi hanno mostrato un effetto stimolatorio dell'estratto, sia quando applicato su cellule del sistema immunitario in coltura, sia quando somministrato intraperitonealmente. Questi effetti includono un aumento della fagocitosi, della chemiotassi e del burst ossidativo sia dei neutrofili (Graissbauer M et al., 1990; Wagner H et al., 1988) che dei macrofagi (Stimpel M et al., 1984).

È stato osservato che in vivo la somministrazione dell'estratto determina un aumento della produzione di TNF, IL-1, IL-6 e IL-10, suggerendo una stimolazione delle funzioni immunitarie sia negli animali sani che immunosoppressi (Steinmuller C et al., 1993).

Anche in questo caso è stato utilizzato un estratto brevettato: la Polinacea (Indena, Milano), con azione immunostimolante e antinfiammatoria. L'estratto si ottiene dalle radici, i costituenti attivi della Polinacea sono i derivati dell'acido caffeico (2% di echinacoside, acido cicorico e acido clorogenico), i polisaccaridi ad alto peso molecolare, l'IDN 5405 (5%); inoltre questo estratto è privo di isobutilammidi note per avere attività immunosoppressiva.

1.4 Loop neuro-endocrino-immunitario: i processi infiammatori

Gli stimoli stressori capaci di evocare una reazione di allarme fanno parte della vita quotidiana, la possibilità che l'individuo ne riduca o ne annulli le conseguenze negative, dipende dalla sua capacità di adattarsi ad essi. Gli adattamenti omeostatici allo stress possono avvenire in quanto l'organismo è dotato di un sistema Neuroendocrino (SNE) in grado di percepire, elaborare e trasformare gli stimoli in messaggi agli organi effettori.

Negli ultimi anni è stato scoperto che il SNE ed il Sistema Immunitario (SI) fanno parte di un circuito biologico totalmente integrato, in quanto gli stessi segnali umorali sono utilizzati sia per lo scambio di informazioni tra gli elementi di uno stesso sistema, sia per le comunicazioni tra i due sistemi. Numerose ricerche, infatti, hanno dimostrato che il SI è in grado di modificare le sue risposte, sia attraverso meccanismi automatici di regolazione, sia mediante segnali provenienti dal Sistema Nervoso Centrale (SNC) e dal sistema endocrino. A loro volta le cellule del SI, trasmettendo segnali al SNE, attivano specifiche risposte neuroendocrine e comportamentali.

E' noto da tempo che le condizioni di stress possono portare a una soppressione delle funzioni immunitarie, come la capacità di superare un'infezione. Esistono prove sicure che dimostrano una interconnessione fra i sistemi endocrino, nervoso e immunitario.

Il sistema nervoso controlla direttamente o indirettamente la produzione di vari ormoni, in particolare gli ormoni corticosurrenali, l'ormone della crescita, la tiroxina e l'adrenalina.

I linfociti esprimono recettori per molti ormoni, neurotrasmettitori e neuropeptidi, inclusi quelli per gli steroidi e le catecolamine (adrenalina e noradrenalina), le encefaline, le endorfine, la sostanza P e il peptide vasoattivo intestinale (VIP). L'espressione di tali recettori e la loro responsività variano nelle diverse popolazioni linfocitarie e monocitarie, così che gli effetti dei differenti trasmettitori possono essere molto diversi nelle varie situazioni.

Un controllo molto importante è assicurato dai corticosteroidi, dalle endorfine e dalle encefaline, ormoni che vengono liberati durante situazioni di stress e che risultano immunosoppressori "in vivo". L'attività soppressiva delle endorfine "in vitro" varia molto a seconda delle quantità e dei sistemi utilizzati; alcuni livelli sono soppressivi, mentre altri potenziano le funzioni immunitarie. Appare comunque chiaro che il più importante controllo retroattivo (a feedback) sulle risposte immunitarie è assicurato dai corticosteroidi. Gli stessi linfociti possono rispondere alla corticotropi-

na liberando il fattore CRF (corticotrophin releasing factor) per produrre ACTH che, a sua volta, induce la liberazione di corticosteroidi.

E' stato ampiamente dimostrato che i corticosteroidi inibiscono la produzione di citochine da parte dei linfociti Th1, mentre stimolano risposte dei linfociti Th2; questi ormoni inducono anche la produzione di $TGF\beta$ che, a sua volta, può inibire le risposte immunitarie.

L'interazione fra il sistema neuroendocrino e quello immunitario non è proprio unidirezionale; è stato dimostrato infatti che le citochine, in particolare IL-1 e IL-6, svolgono un ruolo di modulatori bi-direzionali dell'interazione neuroendocrino-immunitaria. Queste citochine sono potenti stimolatori della secrezione dei corticosteroidi surrenalici mediante l'influenza esercitata sull'ormone corticotropo (CRH). Le citochine IL-1 e IL-6, oltre ad essere secrete rispettivamente dai macrofagi e dalle cellule T, sono sintetizzate anche dai neuroni, dalle cellule gliali e dalle cellule delle ghiandole ipofisarie e surrenale; esse inoltre enfatizzano il loro potenziale come mediatori bi-direzionali nelle risposte allo stress. (Immunologia Ivan Roitt, Jonathan Brostoff, David Male. Edizione Zanichelli 1998)

1.5 L'inflammation

L'inflammation si configura come la risposta fisiologica che un individuo oppone all'ingresso e all'invasione di microrganismi patogeni, mediante l'isolamento, la distruzione e la rimozione di questi agenti nocivi dalle cellule da essi danneggiate.

L'inflammation si manifesta con dei sintomi ben noti da molto tempo: rubor (rossore), calor (aumento della temperatura), dolor (dolore), tumor (edema) e functio lesa (alterazione funzionale). Oggi sappiamo che tali effetti dell'inflammation sono dovuti alla dilatazione dei vasi sanguigni, e all'azione dei fagociti nel sito del danno, all'azione delle citochine e di altri mediatori della risposta infiammatoria rilasciati da macrofagi e mastociti del tessuto connettivo. Numerose sono le vie attraverso cui i patogeni possono fare il loro ingresso nell'organismo: il tratto respiratorio, l'apparato gastrointestinale e riproduttivo in condizioni normali, o attraverso ferite o abrasioni sulle superfici esterne dell'organismo.

Ogni individuo possiede delle prime barriere di tipo meccanico, chimico e fisico, come l'epidermide, il muco, la saliva, le lacrime e la flora microbica eubionte, che rappresentano la prima linea di difesa dell'ospite; nella maggior parte dei casi, quest'ultima è sufficiente a evitare l'invasione dell'organismo da parte del patogeno. Qualora tali barriere non fossero

sufficienti per impedire l'entrata degli agenti potenzialmente infettivi, essi faranno il loro ingresso nei tessuti, dando origine alla cosiddetta risposta infiammatoria.

La risposta infiammatoria può essere classificata come acuta o cronica in base alla sua durata e gravità.

1.5.1 Inflammation acuta

L'inflammation acuta è una risposta rapida al danno tissutale, di breve durata, caratterizzata dalla comparsa di un essudato composto da liquidi, proteine plasmatiche e dalla migrazione di leucociti. Questo processo finemente controllato generalmente porta all'eliminazione dell'agente estraneo e alla guarigione del tessuto danneggiato (Nathan, 2002). Quindi l'inflammation acuta è una risposta di difesa di durata limitata.

1.5.2 L'inflammation cronica e l'invecchiamento

L'inflammation cronica invece è caratterizzata dalla continua presenza (anche per molti anni) di fattori pro-infiammatori a livelli più alti del normale, ma decisamente più bassi di quelli presenti in caso di inflammation acuta.

I tessuti che manifestano l'inflammation cronica, sono caratterizzati dalla presenza di linfociti e macrofagi, ingrossamento dei vasi, fibrosi, e spesso necrosi tissutale (Sarkar D, et al., 2006; Nathan C., 2002).

Molti studi hanno dimostrato che la risposta infiammatoria rappresenta una componente essenziale nella patogenesi di diverse malattie multifattoriali associate con l'invecchiamento (vd. Figura 1.6), che comprendono sia i disturbi reumatici infiammatori cronici che una grande varietà di condizioni, incluso il diabete di tipo 2, le malattie cardiovascolari e neurodegenerative, l'obesità, il cancro, l'asma, e l'invecchiamento. Mentre la risposta infiammatoria che si osserva nei disturbi reumatici sembra essere innescata dall'infezione, nelle altre condizioni citate sembra essere sostenuta da un malfunzionamento tissutale o da uno squilibrio omeostatico (Scriver R. et al, 2011).

L'inflammation cronica può contribuire all'invecchiamento in diversi modi. In primo luogo la continua presenza di fattori pro-infiammatori circolanti, anche se presenti a un basso livello, può tenere il sistema immunitario in uno stato di attivazione cronica. Gli stress antigenici (sia interni che esterni) con cui un individuo viene a contatto nella sua vita, causano la progressiva attivazione dei macrofagi e di altri tipi cellulari coinvolti nella

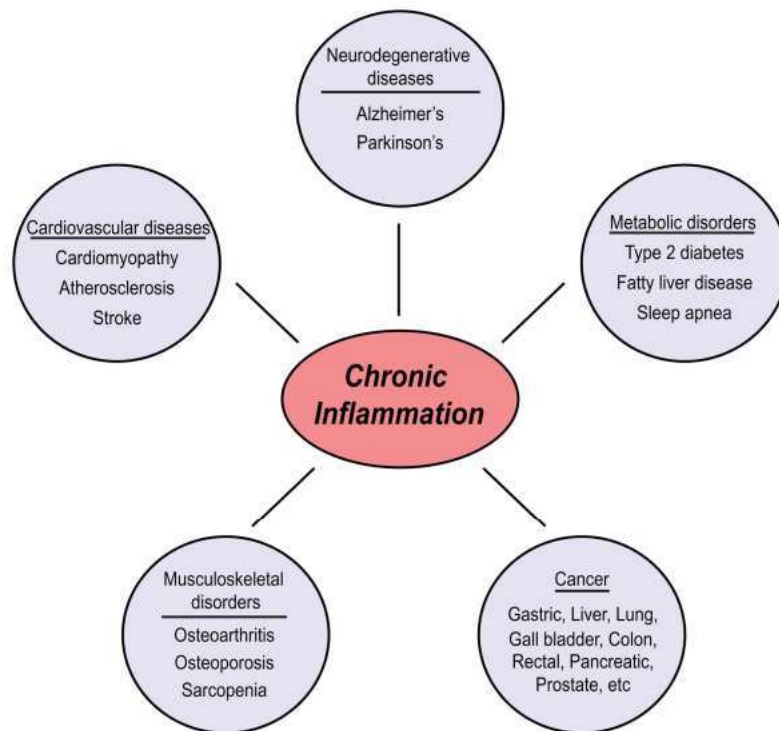


Figura 1.6: L'inflammation cronica è associata con la maggior parte delle malattie correlate con l'invecchiamento. Figura tratta da Freund A et al., 2010

risposta immunitaria. Questa attivazione cronica a basso livello porta alla continua produzione di fattori infiammatori come le citochine e le chemiochine, che aumentano i livelli basali di questi fattori nel corpo. Questo processo chiamato "inflammaging" è stato approfonditamente descritto ed è supportato da un buon numero di dati (Vasto S, et al., 2007; Franceschi C, et al., 2000).

1.5.3 Il sistema immunitario

Il sistema immunitario è l'insieme delle cellule, dei tessuti e delle molecole che mediano la resistenza alle infezioni, la reazione coordinata di queste cellule e molecole alle infezioni microbiche è la risposta immunitaria. La funzione fisiologica del sistema immunitario è quella di prevenire l'insorgenza delle infezioni ed eradicare le infezioni già esistenti.

L'immunità innata e adattativa

Il meccanismo di difesa dell'ospite consiste nell'immunità innata, che media la protezione iniziale contro le infezioni, e l'immunità adattativa che si sviluppa più lentamente e media la successiva, spesso più efficace, difesa contro le infezioni.

Il termine immunità innata (detta anche immunità naturale o nativa) si riferisce al fatto che questo tipo di difesa dell'ospite è sempre presente negli individui sani, pronta a bloccare l'ingresso di microbi e a eliminare rapidamente quelli che entrano nel tessuto dell'ospite.

L'immunità adattativa (chiamata anche immunità specifica o acquisita) è il tipo di difesa dell'ospite che è stimolata dai microbi che invadono i tessuti e cioè si adatta alla presenza dei microbi invasori.

La prima linea di difesa dell'immunità innata è costituita dalle barriere epiteliali e da cellule specializzate, che concorrono a bloccare l'ingresso dei microbi. Se i microbi oltrepassano gli epitelii ed entrano nei tessuti o nella circolazione, essi vengono attaccati dai fagociti, linfociti specializzati chiamati cellule natural killer (NK), e da molte proteine plasmatiche, incluse le proteine del sistema del complemento.

Oltre a fornire la prima misura di difesa contro le infezioni, la risposta dell'immunità innata potenzia la risposta dell'immunità adattativa contro gli agenti infettivi. Sebbene l'immunità innata possa effettivamente combattere molte infezioni, i microbi patogeni per l'uomo (capaci di causare uno stato di malattia) sono evoluti per resistere all'immunità innata. La difesa contro questi agenti infettivi è compito della risposta immunitaria adattativa, e questo è il motivo per il quale difetti nel sistema immunitario adattativo risultano in un'accresciuta sensibilità alle infezioni. Il sistema immunitario adattativo consiste nei linfociti e nei loro prodotti, come gli anticorpi.

Mentre i meccanismi dell'immunità innata riconoscono strutture comuni alle diverse classi di microbi, le cellule dell'immunità adattativa, dette linfociti, esprimono recettori che specificamente riconoscono diverse sostanze prodotte dai microbi oltre a molecole non infettive. Queste sostanze sono chiamate antigeni. La risposta immunitaria adattativa è innescata solo se i microbi o i loro antigeni passano attraverso le barriere epiteliali e sono consegnati agli organi linfoidi dove possono venir riconosciuti dai linfociti. La risposta immunitaria adattativa genera dei meccanismi specializzati a combattere diversi tipi di infezione. Per esempio, la funzione degli anticorpi è quella di eliminare i microbi nei fluidi extra-cellulari, e i linfociti T attivati eliminano i microbi che si trovano all'interno delle cellule. La risposta immunitaria adattativa spesso usa le cellule e le molecole del siste-

ma immunitario innato per eliminare i microbi, e le funzioni dell'immunità adattativa per meglio stimolare questi meccanismi antimicrobici dell'immunità innata. Per esempio, gli anticorpi (un componente dell'immunità adattativa) si legano ai microbi, e questi microbi ricoperti si legano a un fagocita attivato (un componente dell'immunità innata), che ingerisce e distrugge i microbi.

Tutti gli organismi multicellulari, incluse le piante, gli invertebrati e i vertebrati, possiedono un meccanismo intrinseco che li difende dalle infezioni microbiche.

1.5.4 Le cellule del sistema immunitario

Le risposte immunitarie sono mediate dall'intervento di un'ampia varietà di tipi cellulari e di sostanze solubili da queste secrete.

I Fagociti

Fagociti mononucleati e Neutrofili

I due tipi di fagociti circolanti, neutrofili e monociti, sono cellule del sangue che vengono richiamate nel sito di infezione, dove esse riconoscono e ingeriscono le particelle estranee, inclusi i microrganismi. La produzione di neutrofili è stimolata dalle citochine, prodotte da molti tipi cellulari in risposta alle infezioni. I neutrofili agiscono sulle cellule staminali del midollo osseo per stimolare la proliferazione e la maturazione dei precursori dei neutrofili, e sono il primo tipo cellulare a rispondere alla maggior parte delle infezioni, in particolare alle infezioni di origine batterica e fungina.

I Linfociti

I linfociti sono le cellule dell'immunità specifica del sistema immunitario responsabili del riconoscimento specifico dell'antigene, e rappresentano i mediatori iniziali delle risposte immunitarie acquisite. Si distinguono in linfociti B e linfociti T, derivano dalla cellula staminale pluripotente nel midollo osseo, ma mentre i linfociti B maturano nel midollo osseo, i linfociti T maturano nel timo.

Per il differenziamento questi due tipi cellulari seguono vie parallele, composte di una prima fase antigene-indipendente e una seconda fase antigene-dipendente. Nella prima fase negli organi linfoidi primari viene generato l'intero repertorio cellulare capace di fronteggiare un ampissimo spettro di antigeni che l'organismo andrà ad incontrare, e porta alla formazione di linfociti maturi specifici per un singolo antigene. La seconda fase

avviene negli organi linfoidi secondari e viene scatenata dall'incontro dell'antigene. Questo condurrà alla proliferazione clonale dei linfociti attivati dall'antigene e alla differenziazione in popolazioni di elementi effettori (es. plasmacellule anticorpo-secernti per i linfociti B), e di cellule memoria.

Linfociti B

Le cellule B codificano per immunoglobuline specifiche che operano il riconoscimento di un determinato antigene. La funzione delle cellule B consta nel rispondere all'antigene differenziando in plasmacellule secernenti anticorpi della medesima specificità di quella del recettore IgM del linfocita B originario. La funzione dei linfociti B è proteggere dalle infezioni batteriche e dalle infezioni virali (durante la fase extracellulare).

Il differenziamento dei linfociti B avviene attraverso tre processi: il riarrangiamento dei geni che codificano per le regioni variabili delle Ig e assicurano la specificità anticorpale, la proliferazione policlonale, l'espressione di proteine specifiche del tipo cellulare.

Linfociti T

La funzione dei linfociti T può essere effettrice o regolatoria. Effettrice perchè hanno il compito di eliminare direttamente i patogeni intracellulari (es. virus, micobatteri). Regolatoria perchè modulano la funzione dei linfociti B, reclutano le cellule coinvolte nella fase effettrice della risposta immunitaria e ne modulano la funzione.

Il marcatore principale delle cellule T è l'antigene TCR (T-cell receptor). Ne esistono di due tipi: il primo è un eterodimero di due catene polipeptidiche α e β legate da ponti disolfuro; il secondo è costituito dalle catene γ e δ . I linfociti T riconoscono solo antigeni presenti sulla superficie di una cellula in stretta associazione molecolare con le molecole del complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC), dato che il segnale di riconoscimento per il TCR è rappresentato dalle modificazioni steriche del complesso MHC (self) dovuta all'interazione con un frammento di antigene (non self). Le cellule T α β possono essere a loro volta divise in linfociti T Helper (capaci di promuovere sia la risposta dei linfociti B con produzione di anticorpi, sia la proliferazione e attività funzionale dei linfociti T) e linfociti T con attività citotossica.

Nel timo i precursori di origine midollare vengono differenziati in maniera antigene-indipendente in sottopopolazioni funzionalmente diverse di linfociti T maturi che migrano negli organi linfoidi periferici. Al termine del processo le cellule selezionate sono quelle che più efficacemente sono in grado di riconoscere gli antigeni presentati dal MHC, distruggendo così le cellule auto-reattive.

La differenziazione antigene-indipendente culmina con l'espressione sulla

membrana dei linfociti T maturi vergini della molecola CD4 (linfociti T ad attività helper) o della molecola CD8 (linfociti T ad attività citolitica). Le cellule T Helper riconoscono gli antigeni che presentano specificità per associazione con le molecole MHC di classe II, mentre le T citolitiche quelli che hanno specificità con le molecole MHC classe I. La proliferazione e la differenziazione nei timociti sono regolate e mediate da citochine. Indizio di questa considerazione ne sono il fatto che le cellule epiteliali corticali esprimono il recettore per la IL-4, i macrofagi e le cellule epiteliali intratimiche producono IL-1 e i linfociti sono la sorgente principale di IL-2 e IL-4.

Un'ulteriore suddivisione dei linfociti T può essere operata considerando l'attività di sottopopolazioni linfocitarie di T Helper: la prima (denominata Th1), secerne le citochine IL-2 e IFN- γ , mentre un'altra sottopopolazione (Th2) produce IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Per questo motivo le Th1 svolgono funzioni associate alla citotossicità, e difendono l'organismo da microorganismi che si trovano internamente a cellule self (virus o micobatteri). I Th2 stimolano le cellule B alla proliferazione e alla produzione di anticorpi, svolgendo quindi un ruolo nella protezione da microorganismi extracellulari.

Le cellule natural killer

Le cellule natural killer (NK) rappresentano circa il 15% di tutti i linfociti circolanti e si distinguono per il fatto che non esprimono sulla superficie recettori per l'antigene né delle cellule T né di quelle B. La funzione delle cellule NK è quella di riconoscere e uccidere alcune cellule tumorali e le cellule infettate da virus, ma il meccanismo attraverso cui avviene il riconoscimento non è noto del tutto. Le cellule NK sono capaci anche di uccidere le cellule bersaglio rivestite da IgG attraverso il recettore per questi anticorpi. In questo caso si parla di citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente. Infine le cellule NK attivate liberano IFN- γ e altre citochine (come IL-1), che possono risultare importanti nella regolazione dell'emopoiesi e nelle risposte immunitarie.

Le cellule accessorie

Ci sono altre cellule che mediano il processo infiammatorio, con lo scopo principale di attrarre i leucociti e i mediatori solubili dell'immunità verso il sito d'infezione.

I basofili e i mastociti contengono nei loro granuli vari mediatori capaci di provocare nei tessuti circostanti un processo infiammatorio, che vengono

liberati a seguito di uno stimolo. Sia i basofili che i mastociti e le piastrine possono liberare mediatori dell'inflammation che controllano lo sviluppo delle reazioni immunitarie.

1.5.5 Le citochine

La difesa dell'organismo contro gli organismi estranei è mediata da una risposta immune innata e una risposta immune adattativa; la fase effettrice di entrambi i tipi di risposta è in gran parte mediata da proteine ormonali, chiamate citochine (Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Immunologia cellulare e molecolare. Padova: Piccin Editore, 1994).

Le citochine sono una famiglia di molecole proteiche che mediano le interazioni fra le cellule del sistema immunitario e fra queste ed altre cellule dell'organismo. Inizialmente tali molecole venivano chiamate interleuchine (IL), e ancora oggi molte delle citochine sono conosciute col termine di Interleuchine a cui sono stati attribuiti dei numeri progressivi. Nell'immunità innata queste sono prodotte per lo più da fagociti mononucleati, perciò anche dette monochine. Nell'immunità adattativa vengono prodotte dai linfociti T attivati, perciò comunemente denominate linfocine. Sebbene siano una famiglia di proteine molto diverse tra loro, tutte queste molecole presentano caratteristiche comuni in seguito descritte.

Le citochine sono molecole proteiche, generalmente di peso molecolare compreso fra 10 e 50 kD, che agiscono sui loro bersagli cellulari attraverso recettori specifici dotati di alta od altissima affinità di legame, la cui espressione è finemente regolata da segnali solubili spesso rappresentati dagli stessi ligandi.

Le azioni delle citochine possono essere distinte in autocrine (quando la cellula bersaglio di una determinata citochina è rappresentata dalla stessa cellula che la produce), paracrine (quando la cellula bersaglio è localizzata in prossimità della cellula responsabile della produzione) o più raramente endocrine (se la cellula bersaglio è localizzata a distanza rispetto alla cellula responsabile della secrezione e la citochina perviene al bersaglio via il torrente circolatorio).

Le citochine sono pleiotrope, possono cioè indirizzare la loro azione verso molti tipi cellulari diversi, e possono svolgere azioni diverse sullo stesso stipite cellulare. Da questa caratteristica deriva il fatto che la stessa citochina può agire su cellule molto diverse tra loro e non accumulate dalla origine, né dalla localizzazione o dalla funzione.

Un'altra caratteristica delle citochine è la ridondanza delle azioni, cioè molti fattori solubili condividono le stesse azioni, magari anche nei confronti dello stesso tipo cellulare. La produzione delle citochine è finemente

regolata e spesso una o più citochine sono responsabili della stimolazione (o dell'inibizione) della produzione di un'altra citochina; inoltre la produzione delle citochine è generalmente un evento limitato nel tempo e richiede un'attivazione delle cellule che le producono. Dal momento che le azioni delle citochine sono molto varie (stimolanti, inibitorie, regolatorie), così come svariati sono i tipi cellulari sui quali esse agiscono, non è possibile realizzare una classificazione comprensiva di tutte le molecole finora conosciute e/o clonate e di tutti gli aspetti che le caratterizzano.

Sulla base della funzione, le citochine possono essere suddivise in quattro gruppi:

- 1) mediatori dell'immunità naturale, prodotti dai fagociti mononucleati in risposta ad agenti infettivi (IFN- α , IFN- β , TNF- α , IL-1, IL-6, chemochine);
 - 2) attivatori dell'attivazione, della crescita e della differenziazione linfocitaria, prodotti in conseguenza del riconoscimento antigenico da parte dei linfociti T (IL-2, IL-4, transforming growth factor- β);
 - 3) regolatori dell'inflammation immuno-mediata, che attivano cellule infiammatorie non specifiche evocate a seguito del riconoscimento antigenico specifico da parte dei linfociti T (IFN- γ , linfotossina, IL-10, IL-12);
 - 4) sostanze ad azione stimolatrice sulla crescita e sulla differenziazione dei leucociti immaturi, derivati dai linfociti e da altre cellule non linfoide (c-kit, IL-3, granulocyte macrophage colony-stimulating factor, IL-7, IL-9, IL-11).
- (Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Immunologia cellulare e molecolare. Padova: Piccin Editore, 1994)

1.5.6 Le chemochine

Il termine di chemochine è stato adottato per definire una superfamiglia di proteine a basso peso molecolare (6-14 kD) con funzione chemiotattica attive nel richiamo di varie popolazioni cellulari che partecipano alla risposta immune, quali granulociti neutrofili ed eosinofili, monociti e linfociti. La famiglia delle chemochine può essere distinta in quattro sottofamiglie caratterizzate da due a quattro residui cisteinici altamente conservati nella sequenza della molecola. Le due famiglie principali di chemochine sono rappresentate dalle α -chemochine (o CXC-chemochine) che hanno i due residui cisteinici NH₂-terminali separati tra loro da un aminoacido non conservato (X), mentre la famiglia delle β -chemochine (o CC-chemochine) presenta due residui cisteinici giustapposti. La famiglia delle γ -chemochine (o C-chemochine) contiene un solo residuo cisteinico in posizione NH₂-terminale, mentre la famiglia delle δ -chemochine (o CX₃C-chemochine)

mostra i due residui cisteinici tra loro separati da tre residui aminoacidici. La maggior parte delle chemochine umane appartiene alla famiglia delle CXC e CC-chemochine, mentre solo due chemochine dell'uomo appartengono alle altre due famiglie (linfotattina, attiva su cellule T e NK e fraktalina, attiva su monociti e cellule NK, rispettivamente).

Dal punto di vista strutturale le chemochine presentano delle sequenze aminoacidiche molto simili e mostrano una struttura secondaria e terziaria simile. Queste proteine sono dei multimeri (dimeri o tetrameri), la cui struttura è comunque diversa tra CC e CXC chemochine. La IL-8, ad esempio, è un dimerico. La dimerizzazione è sicuramente importante nella funzione di queste molecole, sia perché è necessaria per il legame funzionale con il recettore, ma anche in quanto il legame con molecole complesse *in vivo*, quali i glicosaminoglicani, è favorito e stabilizzato da questa particolare struttura.

Le chemochine esprimono svariate funzioni, molte delle quali largamente sovrapposte, e sono prodotte da una grande varietà di tipi cellulari generalmente coinvolti nelle risposte flogistiche.

Le chemochine agiscono su più tipi cellulari svolgendo un gran numero di azioni descritte *in vitro* quali la chemiotassi, il rilascio di enzimi da depositi intracellulari, la formazione di radicali dell'ossigeno, l'induzione di modifiche al citoscheletro, la formazione di mediatori lipidici e l'induzione dell'adesione all'endotelio o alla matrice extracellulare.

L'espressione coordinata di chemochine e di molecole di adesione regola il traffico linfocitario dal compartimento intravascolare a quello extravascolare. Infine è stata dimostrata l'azione nella regolazione dell'angiogenesi, nella regolazione neuronale e nella morfogenesi.

La chemiotassi è stimolata dalla regolazione dell'espressione di molecole di adesione sulla superficie cellulare (ad es. selettine ed integrine) in modo che le cellule possano aderire in maniera ferma alle cellule endoteliali dopo la fase di rotolamento (rolling) e quindi extravasare. Gli effetti delle chemochine sulla produzione di elementi cellulari del sangue sono duplici. In presenza di G-CSF o GM-CSF, GRO- α , MIP-1 α e β stimolano la maturazione delle cellule staminali verso la linea monocitaria-macrofagica. Le stesse molecole sono tuttavia anche in grado di sopprimere la proliferazione e probabilmente anche la differenziazione di alcuni precursori midollari. Effetti analoghi sono svolti anche da GRO- β , PF4, IL-8, MCP-1, IP-10, mentre altre chemochine (RANTES, NAP-2) non sembrano svolgere alcuna attività emopoietica. La diversa capacità delle chemochine di stimolare od inibire la differenziazione delle cellule staminali emopoietiche non sem-

bra dipendere dalla loro struttura chimica ma piuttosto dal diverso grado di espressione dei recettori per tali chemochine da parte dei precursori midollari.

Una delle principali attività delle chemochine è rappresentata dal richiamo delle cellule immuno-competenti a livello degli organi linfoidi, un ruolo di fondamentale importanza nello sviluppo della risposta immune. I progenitori comuni linfoidi lasciano il midollo osseo e circolano per raggiungere gli organi linfoidi primari guidati da chemochine, specie di tipo CXC. Alcune chemochine espresse a livello midollare sono responsabili del richiamo dei progenitori midollari B verso zone del midollo particolarmente ricche di fattori di crescita e differenziazione per i linfociti B, quali ad esempio la IL 7. Una volta avvenuto l'incontro con l'antigene a livello degli organi linfoidi secondari, i linfociti effettori migrano nuovamente nel torrente circolatorio per localizzarsi nelle sedi di infiammazione. Contemporaneamente si vengono a formare le cellule della memoria immunologica, sia T che B, che possiedono diverse capacità migratorie verso gli organi linfoidi terziari (cute, intestino, ecc.), oltre a potersi localizzare in tessuti non linfoidi dove si trovano gli antigeni che li hanno attivati e che sono stati responsabili della loro espansione. L'attivazione linfocitaria è responsabile dell'aumentata espressione di numerosi recettori di superficie, compresi i recettori per le chemochine, con conseguente aumento della suscettibilità delle cellule all'azione chemiotattica di queste proteine.

1.6 Modelli sperimentali

1.6.1 Il modello cellulare

I granulociti neutrofili sono i leucociti circolanti che, insieme a macrofagi e cellule dendritiche, costituiscono quella che viene definita la prima linea di difesa dell'organismo.

Essi sono i primi leucociti circolanti nei vasi sanguigni ad essere reclutati al sito d'infezione, grazie ad un gradiente chemiotattico instaurato dalle citochine e chemochine pro-infiammatorie rilasciate dai macrofagi tissutali.

Il ruolo chiave dei neutrofili nella risposta immunitaria innata, li rende un buon modello cellulare per uno screening preliminare degli estratti vegetali di *Curcuma longa* ed *Echinacea angustifolia* rispetto alla loro tossicità e alla capacità di modulare alcuni parametri d'interesse. In particolare si è valutata la capacità degli estratti di modulare l'adesione cellulare e la produzione di superossidi, caratteristiche peculiari dei neutrofili attivati in

seguito descritte. Nel nostro caso i neutrofili sono stati isolati da sangue intero ovino, la scelta di utilizzare gli ovini come donatori è dovuta al fatto che essi costituiscono una fonte di materiale fresco, e inoltre le colture cellulari di neutrofili ovini rappresentano un noto modello cellulare all'interno del nostro gruppo di lavoro (Farinacci et al., 2008).

Il reclutamento dei neutrofili al sito d'infezione è un passaggio cruciale per lo sviluppo di un'appropriata risposta infiammatoria. In particolar modo, il richiamo dei neutrofili nel tessuto danneggiato prevede vari passaggi di adesione e di migrazione, che sono mediati da tre classi di recettori: le selettine, le integrine e i recettori di adesione della superfamiglia delle immunoglobuline.

Le selettine sono glicoproteine transmembrinarie con un dominio che lega specifici gruppi di carboidrati; i membri di questa famiglia sono indotti sull'endotelio attivato ed iniziano le interazioni endotelio-leucociti, legandosi a ligandi oligosaccaridici sui leucociti.

Lo stadio successivo nel richiamo dei leucociti dipende da adesioni più strette, dovute al legame di molecole di adesione intercellulare o ICAMs sull'endotelio, con proteine eterodimeriche della famiglia delle integrine sui leucociti.

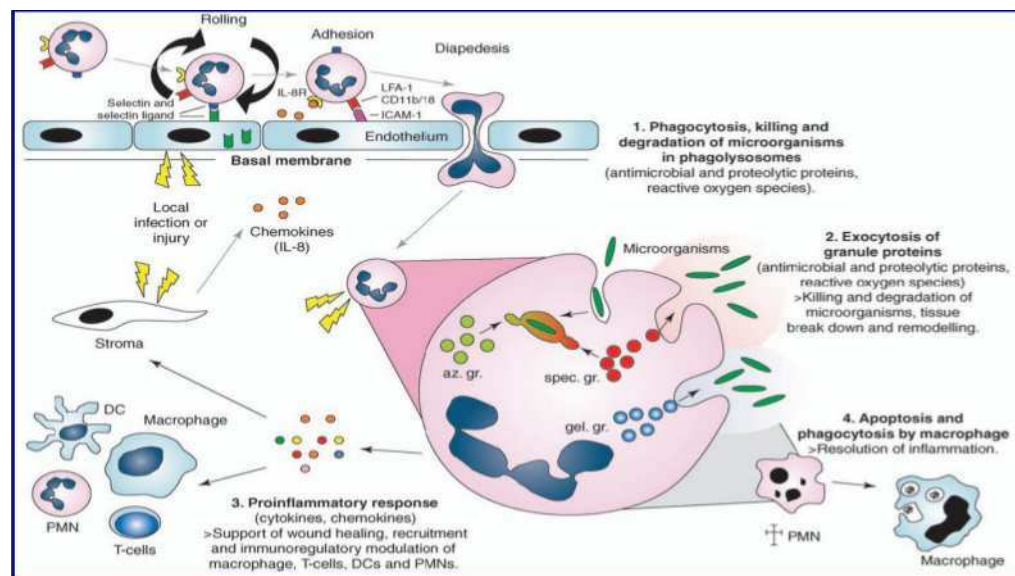


Figura 1.7: Difesa immunitaria innata operata dai neutrofili. Tratto da Theilgaard-Mönch K et al., 2006

Gli eventi che conducono alla risposta infiammatoria comprendono: il

legame del neutrofilo alla parete del vaso sanguigno (“tethering” o cattura), il rotolamento lungo di esso (“rolling”), l’arresto, la stabilizzazione dell’adesione e la diapedesi (migrazione dal lume del vaso al tessuto sito d’inflammazione), in Figura 1.7 è possibile osservare il meccanismo d’azione operato dai neutrofili nella difesa immunitaria innata.

In condizioni normali, i leucociti scorrono nel centro dei piccoli vasi sanguigni, dove il flusso sanguigno è più rapido. Nei siti infiammatori, dove i vasi sono dilatati, il flusso sanguigno è più lento e ciò permette ai leucociti di muoversi fuori dal centro del vaso sanguigno e di interagire con l’endotelio vascolare. I neutrofili raggiungono il sito d’inflammazione grazie ad un gradiente che aumenta in concentrazione verso il sito d’infezione, il quale è prodotto da chemochine legate alla matrice extracellulare e alla superficie delle cellule endoteliali; nello specifico, i fattori di stimolo più importanti sono il TNF, l’IFN- γ , l’LPS batterico e le varie interleuchine, fra le più importanti, IL-1, IL-8, IL-6 e IL-4, che vengono rilasciati, in particolar modo, da macrofagi presenti nel tessuto connettivo. Essi attivano le cellule epiteliali che rivestono il capillare sanguigno inducendole ad esprimere un numero maggiore di molecole di adesione, le quali facilitano il legame dei neutrofili alla parete del vaso, rendendo così possibile il passaggio finale della diapedesi. La riduzione del flusso sanguigno, dovuto anche alla vasodilatazione per effetto dell’istamina rilasciata dai macrofagi e dai mastociti del tessuto danneggiato, permette un’adesione transitoria, definita “tethering” e si risolve nel rotolamento dei leucociti lungo l’endotelio. Durante questo step, i neutrofili rispondono ai ligandi, principalmente chemochine, disperse sulla superficie dell’endotelio e grazie ad una cascata segnaletica intracellulare, viene innescata l’adesione forte.

I primi due eventi di tethering e rolling dipendono da molecole definite selettine: esse sono una famiglia di glicoproteine transmembranarie di tipo I, calcio-dipendenti. Le selettine coinvolte includono la E-, la P- e la L-selettina. Le prime due sono espresse sulla superficie delle cellule endoteliali, invece la L-selettina sui neutrofili.

La successiva adesione forte alla parete del vaso dei neutrofili è dovuta in primo luogo all’azione delle chemochine, citochine chemoattraenti, la cui fonte primaria è rappresentata da leucociti circolanti, macrofagi e cellule tissutali, quali i fibroblasti, le cellule epidermiche o epiteliali. La produzione di chemochine è indotta da citochine pro-infiammatorie, come i già citati TNF- α , IL-1 e IL-4. Le chemochine contribuiscono al reclutamento dei neutrofili dapprima attivando le integrine e poi promuovendo la migrazione dei leucociti attraverso l’endotelio. In particolar modo, inducono un cambio conformazionale nelle integrine che formano un legame ad alta

affinità con i loro recettori sui neutrofili. Le integrine sono una famiglia di molecole che hanno una struttura comune, determinata dall'associazione di una subunità α e β ; in particolar modo l'integrina maggiormente coinvolta è la $\beta 2$. L'apparizione di queste molecole sulle pareti dei vasi avviene da una a due ore dopo la stimolazione da parte di IL-1, TNF- α e LPS. L'adesione forte dei neutrofili alle cellule endoteliali avviene grazie all'interazione delle integrine della famiglia $\beta 2$ dei leucociti con ICAM-1. La successiva migrazione avviene fra le giunzioni delle cellule epiteliali, diminuendo l'abilità di queste ultime di fungere da barriera. L'adesione forte fra cellula epiteliale e neutrofilo induce la catena respiratoria e la produzione di superossidi.

Una volta raggiunto il sito d'infezione, i neutrofili riconoscono il microrganismo estraneo grazie a dei recettori di superficie, inglobano il patogeno al loro interno ed espletano la loro funzione fagocitica. Una volta formatosi il fagolisosoma, due sono gli eventi che avvengono: la generazione di specie reattive dell'ossigeno mediante assemblamento ed attivazione dell'ossidasi NADPH-dipendente ed il rilascio di proteine enzimatiche ed antimicrobiche contenute nei granuli. L'attivazione del metabolismo ossidativo, conosciuto come "burst respiratorio", coinvolge, in primo luogo, la NADPH-ossidasi, un complesso enzimatico composto da proteine citosoliche e di membrana. Questo complesso enzimatico è capace di generare anione superossido (O_2^-) che può trasformarsi in H_2O_2 . Gli intermedi della riduzione di O_2 in H_2O_2 sono l'anione superossido (O_2^-), H_2O_2 e OH, i quali sono formati per aggiunte successive di elettroni. Con l'ossigeno può reagire poi l'ossido nitrico (NO), e la loro unione porta alla formazione di specie ossidanti ancora più forti (Witko-Sarsat et al. 2000). I microorganismi ingeriti sono demoliti attraverso la generazione di specie reattive dell'ossigeno.

1.6.2 Il modello animale

Per il nostro progetto di studi l'osteotrite rappresenta un buon modello *in vivo* di infiammazione spontanea, e il trattamento con curcuma risulta interessante anche alla luce delle evidenze scientifiche che propongono la curcuma come un buon agente antinfiammatorio.

L'osteoartrite (OA) è una delle più comuni malattie croniche dell'apparato muscoloscheletrico e causa di zoppie e invalidità nei cani (Bennet, 1990; Innes, 1995).

Questa malattia degenerativa è dovuta ad una progressiva modificazione fenotipica dei condrociti, caratterizzata da un'eccessiva produzione di fattori catabolici, incluse metalloproteasi e specie reattive dell'ossigeno. Inoltre

l'osteoartrite è associata a cambiamenti extracellulari che portano a una progressiva degradazione e all'eventuale perdita della cartilagine articolare, e a un danno dell'osso subcondrale, frequentemente associati a leggere sinoviti secondarie (Creamer et al., 1997; Felson et al., 1998).

Sebbene fattori concomitanti, inclusa l'età e l'obesità, concorrano ad aumentare la progressione della malattia, si pensa che i fattori meccanici predominino nell'eziopatogenesi dell'OA nel cane (Henrotin et al., 2005).

Per il trattamento terapeutico dell'OA vengono generalmente somministrati farmaci antinfiammatori non steroidei (NSAIDs-non steroidal anti-inflammatory drugs), che trattano solo i sintomi dell'OA, diminuendo il dolore e l'infiammazione (Innes et al., 2003). Gli effetti terapeutici di questi farmaci si manifestano attraverso l'inibizione degli enzimi ciclossigenasi (COX), responsabili della produzione di prostaglandine e tromboxani. Ci sono due isoforme dell'enzima COX, la forma costitutivamente attiva, COX-1, e la forma inducibile COX-2. Se l'inibizione di COX-2 determina molti dei benefici terapeutici associati al trattamento con NSAIDs, si pensa che l'inibizione di COX-1 sia invece responsabile degli effetti collaterali gastrointestinali (Buttgereit and al., 2001).

Per questi motivi si cercano dei trattamenti alternativi e recentemente, per la cura dell'osteoartrite nel cane, sono stati proposti nuovi nutraceutici, come la curcumina (Henrotin et al., 2005, Innes et al., 2003). In studi *in vitro* è stato riportato che la curcumina è simile ai NSAIDs nel sopprimere la produzione e l'azione catabolica delle citochine pro-infiammatorie come l'interleuchina-1 β e il TNF- α , che giocano un ruolo chiave nella patogenesi dell'OA (Shakibaei et al., 2007).

È stato anche osservato che la curcumina *in vitro* è un importante riduttore delle specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (Sreejayan and Rao, 1996; Sreejayan and Rao, 1997), caratteristica molto importante considerato che la degradazione della cartilagine è il risultato della combinazione di stress meccanici e fattori biochimici, principalmente metalloproteasi e ROS (Henrotin and Kurz, 2007).

1.7 La tecnologia del DNA microarray

L'avvento del sequenziamento del DNA su larga scala ha arricchito la nostra conoscenza delle sequenze genomiche dell'uomo e di altri organismi e ha permesso una percezione preventiva delle complesse reti che intervengono tra i geni che vengono codificati.

Varie tecniche che forniscono una veloce valutazione dei profili di espres-

sione genica di centinaia o migliaia di geni in un singolo esperimento, ci permettono di ottenere una grande quantità di dati utili per acquisire nuove conoscenze sulla funzione dei geni, sulla loro regolazione e le loro interazioni.

La tecnologia del DNA microarray è stata sviluppata agli inizi degli anni '90 e consiste in una griglia ordinata di molecole di DNA a sequenza nota, fissate in posizioni note su un substrato solido e dette probes (sonde), che vengono poste ad ibridare con i target, costituiti dall'RNA del campione di interesse retrotrascritto a cDNA. Il cDNA si lega specificamente solo alla sonda di DNA a singola elica complementare presente nel vetrino e non ad altre. Questo metodo permette l'analisi parallela di un gran numero di geni sfruttando le caratteristiche peculiari della doppia elica del DNA, ovvero la natura complementare delle due catene e la specificità dell'accoppiamento delle basi.

Come si può osservare in Figura 1.8 in un tipico esperimento microarray si isola l'mRNA dei campioni che si vogliono prendere in esame, dunque ipotizzando di voler confrontare un tessuto sano (Campione 1) con un tessuto malato (Campione 2), avremo due popolazioni di mRNA che rappresentano tutti i geni espressi nelle cellule normali e in quelle affette dalla patologia in esame. Usando la trascrittasi inversa l'mRNA di ogni tipo cellulare viene convertito in cDNA e marcato. La marcatura è generalmente rappresentata da una molecola fluorescente, ad esempio una fluoresceina oppure un colorante di cianidrina, comunemente il colorante verde Cy3 ed il rosso Cy5. I campioni così marcati vengono poi fatti ibridare sullo stesso substrato. Conclusa l'ibridazione, gli array vengono lavati con delle soluzioni saline per eliminare l'eccesso di target e per rimuovere ciò che si è legato in modo aspecifico.

Il microarray viene sottoposto a scansione per rilevare l'intensità del segnale che è proporzionale alla quantità di target legato. L'ibridazione avviene in maniera competitiva ed il sistema di rilevamento per fluorescenza permette di osservare il segnale proveniente solo dal Cy3 o Cy5 o il segnale complessivo, derivante dalla combinazione di colori dei due fluorofori. Questi ultimi sono dei composti che assorbono l'energia luminosa ad una data lunghezza d'onda per poi restituirla ad una lunghezza d'onda diversa, sotto forma di luce. Se i fluorofori utilizzati per la marcatura dei due campioni sono di tipo diverso, emettono a lunghezze d'onda differenti che possono venir rilevate in modo separato. Anche l'intensità del segnale è importante perché è legata al numero di molecole di target e di sonda che si sono ibridate tra di loro. Il rilevamento per fluorescenza avviene attraverso uno scanner il cui laser passa in rassegna l'intera superficie del substrato.

Ciò che si ottiene sono una serie di spots visibili in un computer collegato allo scanner, ognuno dei quali rappresenta un gene; gli spots appariranno di intensità diversa, in base al loro livello di espressione (normale, sovra o sottoespresso).

Nell'esperimento da noi condotto è stato utilizzato un sistema single-channel microarray detto anche one-color microarray, caratterizzato dall'impiego di un solo fluoroforo. I dati di intensità di ciascuna sonda indicano il livello relativo di ibridazione del target marcato, e il confronto del livello di espressione dello stesso gene in due diverse condizioni sperimentali necessita dell'allestimento di due separate ibridazioni.

I geni che risultano sovra o sottoespressi vengono sottoposti a validazione, cioè ad ulteriori prove di conferma utilizzando altre metodiche come Northern Blot o Real Time PCR.

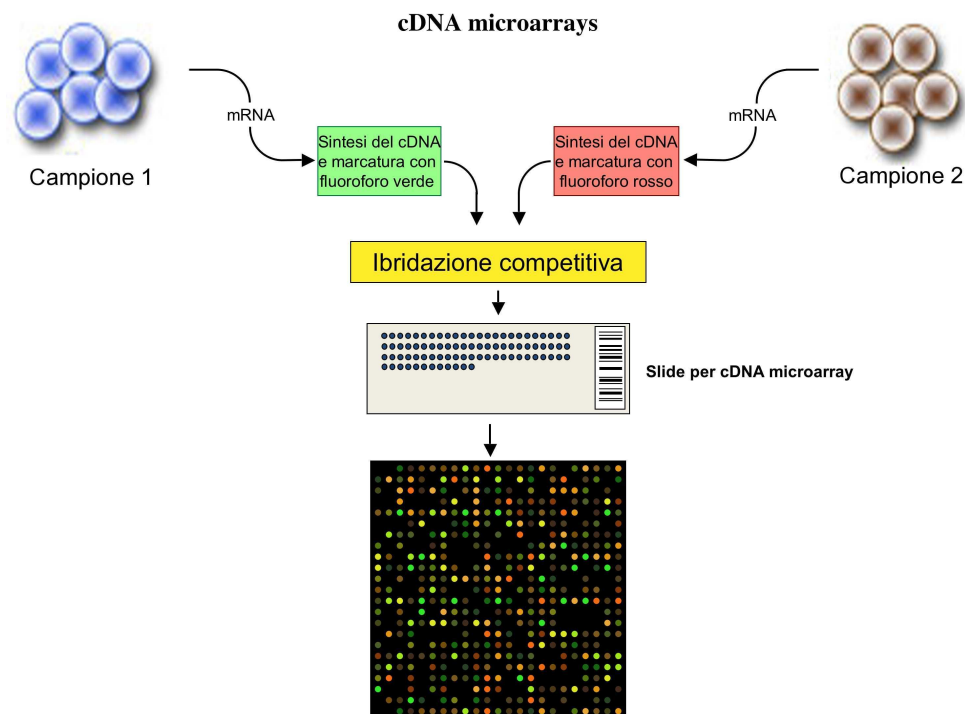


Figura 1.8: Esperimento microarray a due colori.

Con questa tecnologia è possibile misurare contemporaneamente l'attività trascrizionale di tutti i geni presi in considerazione, nel nostro caso di tutto il genoma del cane (*Canis familiaris*).

I microarray a DNA possono essere usati per confrontare i pattern di

espressione genica in due o più tessuti, negli stessi tessuti in tempi differenti durante lo sviluppo, in cellule di tessuti normali e patologici, in soggetti trattati e non trattati con la sostanza d'interesse, consentendo in questo modo di mettere in luce le differenze tra le condizioni sperimentali in esame.

Capitolo 2

Scopo

Il progetto di studio si pone come obbiettivo l'analisi degli effetti a livello cellulare e molecolare, che nutraceutici bioattivi naturali possono avere quando inseriti nell'alimentazione animale. In particolare l'interesse è rivolto verso quegli alimenti funzionali che possano fornire, oltre alle basilari sostanze nutritive, anche composti di origine naturale con proprietà immunostimolanti e immunomodulatorie, da impiegare per il trattamento degli stati infiammatori. In questo contesto, sulla base della precedente esperienza del gruppo di ricerca, e sulla base della produzione scientifica esistente, si è scelto di studiare in particolare le proprietà bioattive degli estratti di *Curcuma longa* ed *Echinacea angustifolia*, prodotti di origine vegetale interessanti per il trattamento di stati infiammatori.

Per il raggiungimento di tale obbiettivo è stato strutturato un piano sperimentale che ha previsto una prima fase di studio *in vitro* e una seconda fase *in vivo*.

La fase preliminare *in vitro* ha previsto l'utilizzo delle linee cellulari Chang liver e Raw 264.7, e di colture primarie di neutrofili ovini, che hanno consentito di testare i composti nutraceutici in esame per la loro citotossicità e le loro proprietà antiossidanti e immunomodulatorie.

La sperimentazione è poi continuata *in vivo* attraverso l'allestimento di due prove distinte che hanno previsto l'isolamento dell'RNA dal sangue intero dei soggetti in esame. Nella prima prova, su cani sani, sono stati vagliati gli effetti di entrambi gli estratti sull'espressione genica di specifici geni target coinvolti nel processo infiammatorio. La seconda prova è stata invece effettuata su soggetti affetti da osteoartrite, un modello di infiammazione cronica spontanea, allo scopo di valutare l'effetto globale a livello di espressione genica dell'estratto di *Curcuma longa*, secondo un approccio nutrigenomico.

Capitolo 3

Materiali e metodi

3.1 Caratteristiche degli estratti

Gli estratti di Curcuma fosfolipide (nome commerciale Meriva®) e di Echinacea angustifolia (nome commerciale Polinacea®), sono stati forniti da Indena Spa, Milano Italy. Le caratteristiche degli estratti sono riportate in tabella 3.1 e 3.2.

Gli estratti di Curcuma fosfolipide e Polinacea sono stati dissolti in DMSO (dimetilsolfossido) rispettivamente alla concentrazione di 10 mg/ml e 50 mg/ml, filtrati (filtro 0,20 µm) e conservati al buio a -20 °C.

3.2 Modulazione dell'attività di neutrofili ovini *in vitro*

Al fine di valutare l'attività antinfiammatoria degli estratti, sono state prese in considerazione la capacità di adesione e la produzione di superossidi di neutrofili isolati da sangue di pecora. Lo stato pro-infiammatorio dei neutrofili è stato indotto incubando le cellule con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), un composto che attiva i neutrofili ovini (Sartorelli et al., 2000).

Prima di effettuare i test funzionali sopra citati, è stata valutata la tossicità degli estratti in esame tramite il test di vitalità cellulare (MTT, vd. 3.2.2) sui neutrofili ovini isolati da sangue intero.

3.2.1 Isolamento di neutrofili da sangue ovino

I soggetti utilizzati per i prelievi di sangue erano pecore adulte, sane, non gravide e non in lattazione. Da ciascun soggetto sono stati prelevati dalla

Determinazione	Risultati
Titolo HPLC di curcuminoidi totali	19%
Caratteri (polvere arancione di odore caratteristico)	conforme
Granulometria	95%
Acqua	0,7%
Ceneri totali	4,2%
Metalli pesanti	Conforme (ppm)
Solventi organici residui: etanolo	2514 ppm
Conta microbica aerobica totale	100 ufc/g
Conta totale combinata muffe/lieviti	<10 ufc/g
Batteri gram negativi bile tolleranti	Assenti (ufc/g)
Escherichia coli	Assente (/g)
Salmonella	Assente (/10g)
Pseudomonas aeruginosa	Assente (/g)
Staphylococcus aureus	Assente (/g)

Tabella 3.1: Caratteristiche dell'estratto di Curcuma fosfolipide.

vena giugulare 40 ml di sangue, utilizzando monovette (Sarstedt, Italia) da 9 ml contenenti 1,6 ml di EDTA, mantenute a $+4-8^{\circ}\text{C}$ dopo il prelievo. I neutrofili sono stati isolati per mezzo del metodo di Carlson e Kaneko (1973) in seguito descritto. Il sangue è stato centrifugato 15' a $1000 \times g$ a 4°C . Al termine della centrifugazione è stata rimossa la parte superiore costituita da plasma, buffy coat e un primo strato di 3 mm del pellet di eritrociti e granulociti. Sul pellet ottenuto, costituito da eritrociti e granulociti, si è effettuata una lisi ipotonica per rimuovere gli eritrociti. La lisi degli eritrociti si è ottenuta aggiungendo 20 ml di acqua distillata ad ogni pellet, e agitando ciascun tubo per inversione per 30".

La reazione di lisi ipotonica è stata bloccata aggiungendo 10 ml di NaCl al 2,7% in buffer fosfato (0,0132 M, pH 7,2), per permettere di ristabilire l'isotonicità. Ogni tubo è quindi stato sottoposto a centrifugazione per 10' a $400 \times g$ a 4°C . Si è proceduto poi prelevando il surnatante e ripetendo la lisi.

Aspirato il surnatante per la seconda volta, i pellet sono stati sottoposti ad un doppio lavaggio in PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,2, con NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM e KH_2PO_4 1,8 mM), infine sono stati riuniti in un unico tubo e risospesi in terreno RPMI-1640 20mM HEPES (acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico, soluzione

Determinazione	Risultati
Titolo HPLC di echinacoside, riferito alla sostanza essiccata	3,5%
Titolo HPLC di IDN 5405, riferito alla sostanza essiccata	19,6%
Titolo HPLC di alchilammidi totali, riferito alla sostanza essiccata	0,003%
Caratteri (polvere amorfa di colore giallo-bruno)	Conforme
Perdita di peso (°C=105, t=16 ore)	5,6%
Ceneri totali	6,3%
Arsenico	0,9 ppm
Piombo	<0,5 ppm
Cadmio	<0,1 ppm
Mercurio	0,06 ppm
Solventi totali residui: etanolo	0,1%
Solventi totali residui: esano	Assente (ppm)
Somma di altri solventi	<27%
Conta microbica aerobica totale	105 ufc/g
Conta totale combinata muffe/lieviti	<10 ufc/g
Batteri gram negativi bile tolleranti	<10 ufc/g
Escherichia coli	Assente (/g)
Salmonella	Assente (/10g)
Pseudomonas aeruginosa	Assente (/g)
Staphylococcus aureus	Assente (/g)

Tabella 3.2: Caratteristiche dell'estratto di Polinacea.

tampone organica usata nelle colture cellulari per mantenere stabile il pH fisiologico).

Le cellule sono state contaminate in camera di Neubauer con il metodo del Tripan Blue (Phillips e Terryberry, 1957) e poi risospese in RPMI-1640 20 mM HEPES ad una concentrazione finale di 2×10^6 cell/ml. La purezza della coltura cellulare è stata valutata per mezzo della colorazione con la soluzione di Türk, che permette di mettere in evidenza i nuclei delle cellule (Getting et al. 1999) e identificare i PMN per la caratteristica morfologia dei nuclei polilobati. A seguito dell'isolamento, la vitalità cellulare e la purezza delle cellule è risultata superiore al 99% e al 95% rispettivamente.

3.2.2 Test cellulari: MTT, ADH, SOD

Per eseguire i test cellulari sono state utilizzate piastre in polistirene da 96 pozzetti (Nunc, Roskilde, Denmark) trattate con gelatina bovina (5 mg/ml in PBS), che permette di prevenire l'attivazione spontanea dei neutrofili dovuta al contatto con la plastica del supporto. Nei pozzetti delle piastre sono stati dispensati 150 μ l di gelatina e sono state incubate per 60' a 37°C. Al termine dell'incubazione sono state lavate tre volte con PBS.

In tutti gli esperimenti la sospensione cellulare è stata seminata alla concentrazione di 2×10^6 cell/ml (3×10^5 cell/pozzetto) predisponendo 5 repliche per ciascuna condizione sperimentale.

L'estratto di *Curcuma longa* è stato utilizzato alle concentrazioni 2,8 - 7,4 - 20 - 54 μ g/ml, quello di *Echinacea angustifolia* è stato invece testato alle concentrazioni finali di 6,7 - 20 - 60 - 180 μ g/ml.

Il controllo negativo era costituito dalla sospensione cellulare trattata con DMSO allo 0,36%.

I neutrofili sono stati incubati con gli estratti per un'ora a 37°C e al 5% CO₂.

Ciascuno dei test cellulari in seguito descritti, è stato condotto sui neutrofili isolati da quattro soggetti.

Test MTT

L'MTT è un test colorimetrico che permette di stimare il numero di cellule vive presenti in coltura.

Questo test si basa sulla proprietà dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi delle cellule vitali di ridurre il composto MTT sale di tetrazolio, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) a cristalli di formazano di colore blu.

Le cellule vitali, a differenza di quelle non vitali, riducono l'MTT e l'am-

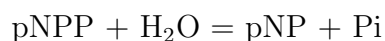
montare del formazano prodotto è proporzionale al numero di cellule vive presenti.

Per eseguire questo test in ciascun pozzetto della piastra, già trattata con gelatina, è stata trasferita la sospensione cellulare, l'MTT alla concentrazione finale di 0,5 mg/ml e gli estratti a concentrazioni crescenti. È seguita un'incubazione di 3 h a 37 °C al 5% di CO₂. Al termine del periodo di incubazione, la piastra è stata centrifugata per 15' a 500 × g e il terreno aspirato.

I cristalli di formazano formati sono stati disciolti in 100 μl di DMSO e i valori di assorbanza sono stati rilevati mediante lettura dell'assorbanza a 550 nm nel lettore automatico di piastre.

Test ADH

Il test di adesione dei neutrofili consiste in un saggio colorimetrico che valuta l'attività della fosfatasi acida delle cellule adese. La fosfatasi acida è un enzima che catalizza l'idrolisi del composto pNPP (para-Nitrophenyl-phosphate) in pNP (para-Nitrophenol) e fosfato inorganico secondo la reazione:



Misurando l'ammontare di pNP presente si può risalire all'attività della fosfatasi acida proporzionale al numero di cellule adese.

Sono state utilizzate piastre da 96 pozzetti in cui sono stati dispensati 75 μl di sospensione cellulare (3x10⁵ cell/pozzetto), la piastra è stata inizialmente incubata 10' a 37 °C al 5% CO₂.

Al termine dell'incubazione nella metà dei pozzetti trattati è stato aggiunto terreno con PMA (Phorbol Myristate Acetate 10⁻⁷ mol/l) (Sigma) che induce lo stimolo infiammatorio, e nell'altra metà dei pozzetti terreno senza PMA; è seguita una seconda incubazione di 25' a 37 °C al 5% CO₂.

Al termine del periodo di incubazione è stato eseguito un doppio lavaggio con PBS, sono stati poi aggiunti 100 μl di buffer acetato 0,15 M (pH 5,3 contenenti Triton X-100 allo 0,2%); la piastra è poi lasciata 5' a temperatura ambiente. A seguire in ciascun pozzetto sono stati addizionati 100 μl di buffer acetato 0,15M (pH 5,3 contenente 10 mmol/l di pNPP) e il tutto posto 30' al buio a temperatura ambiente. Infine la reazione è stata bloccata ponendo 100 μl di NaOH 2N in ciascun pozzetto, l'assorbanza è stata misurata nel lettore automatico di piastre a 410 nm.

Test SOD

La produzione dei superossidi da parte dei neutrofilo è stata misurata tramite la riduzione del ferrocitocromo c di cuore equino specificamente inibibile dalla superossido dismutasi (SOD) (Babior et al., 1973).

I neutrofilo pre-trattati sono stati seminati in piastre da 96 pozzetti e incubati 10 minuti a 37 °C al 5% CO₂. Dopo l'incubazione sono stati aggiunti 50 µl di ferrocitocromo c (concentrazione finale 0,054 mmol/l in HBSS), con o senza PMA (10⁻⁷ mol/l) e in metà piastra sono stati aggiunti 10 µl di SOD (300 U) (Sigma). Per confermare che la riduzione del ferrocitocromo c è inibita dalla SOD, pozzetti con 700U di superossido dismutasi sono stati utilizzati come bianco. La reazione è stata seguita misurando l'assorbanza a 550 nm a intervalli di 5' per 40'. Le nanomoli di superossidi prodotti dopo 40' vengono calcolati con il coefficiente di estinzione molare 21.1/mM/cm, utilizzando la seguente formula: nanomoli di O₂⁻ per pozzetto = (O.D.550nm × 100)/6.3

3.2.3 Analisi statistica dei dati

I risultati dei test sono stati espressi come percentuale dei valori grezzi di O.D. (per il test di vitalità e adesione) e di nmolO₂⁻ (per il test di produzione di superossidi) delle cellule trattate con gli estratti rispetto a quelle di controllo. Per analizzare l'effetto dose-risposta degli estratti, i risultati percentuali dei test (variabili dipendenti) sono stati regressi sulle concentrazioni di estratto tramite il software SPSS package (SPSS 16.0). La regressione è stata considerata significativa per valori di p<0.05 e altamente significativa per p<0.005.

3.3 Linee cellulari stabilizzate

Le linee cellulari utilizzate sono le Chang liver, derivate da tessuto di fegato sano di *Homo sapiens*, e le RAW 264.7, monociti/macrofagi di *Mus musculus*.

Entrambe le linee cellulari utilizzate crescono in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma) addizionato del 10% di siero fetale bovino (FBS, Sigma) e di penicillina (100U/ml), streptomicina (100 µg/ml) e L-Glutamina (2 mM finale).

Il terreno DMEM contiene elementi nutritivi di base necessari al metabolismo cellulare quali glucosio, amminoacidi, sali minerali e vitamine. Inoltre è addizionato di Rosso Fenolo, un indicatore di pH che rende il terreno rosso-arancio se il pH è correttamente equilibrato (pH 7,3 in presenza di

CO_2 al 5%), giallo per valori di pH minori di 6,8 e tendente al violaceo per valori superiori a 8,6. Il siero fetale bovino (FBS) fornisce i fattori di crescita che stimolano la replicazione *in vitro* e alcuni fattori di adesione (almeno fibronectina e vitronectina); gli antibiotici invece sono aggiunti per evitare possibili contaminazioni batteriche accidentali. Il siero è stato addizionato al terreno solo nella fase di crescita delle colture cellulari, nel momento dell'allestimento della prova sperimentale si è utilizzato terreno senza siero.

Queste linee cellulari crescono adese alla superficie di opportuni contenitori per coltura ("flask", petri, o pozzetti) e duplicano fino ad occupare tutta l'area disponibile, e cioè fino a confluenza. Quando una coltura è confluyente le cellule tendono ad arrestare la loro crescita e ad uscire dal ciclo replicativo. Devono quindi essere staccate dal fondo, diluite e trasferite in nuovi contenitori per la crescita ("passaggio delle cellule").

Il passaggio di queste due linee cellulari viene fatto in due modi diversi. Le Chang liver vengono lavate due volte in PBS (10 mM tampone fosfato pH 7.4, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl), poi incubate a 37°C per circa 5 minuti con una soluzione di tripsina 0.05 w/v ed EDTA (acido etilendiamminotetraacetico) 0.02% w/v. La tripsina degrada le proteine della matrice che mantengono le cellule adese alla parete del contenitore in cui crescono in contatto reciproco, l'EDTA invece è un chelante del Ca^{2+} e del Mg^{2+} indispensabile all'adesione. L'azione della tripsina viene bloccata prima che provochi un danno alla struttura delle singole cellule, aggiungendo terreno completo. Per eliminare ogni residuo di tripsina, le cellule sono centrifugate a 1000 rpm per 5 minuti e poi risospese nel terreno di crescita alla diluizione necessaria ad ottenere la concentrazione finale ottimale per la crescita o per l'utilizzo negli esperimenti.

Anche le RAW 264.7 vengono lavate due volte in PBS ma poi vengono staccate meccanicamente tramite uno "scraper".

Il fattore di diluizione necessario e il tempo impiegato da ogni linea per raggiungere la confluenza sono variabili e dipendono dalla capacità di adesione e dal tempo di duplicazione tipico di ogni linea cellulare.

Le Chang liver sono state utilizzate per vagliare la tossicità degli estratti, per mezzo di test di vitalità MTT descritti precedentemente. Anche in questo caso l'estratto di Curcuma longa è stato utilizzato alle concentrazioni 2,8 - 7,4 - 20 - 54 $\mu g/ml$, quello di Echinacea angustifolia è stato invece testato alle concentrazioni finali di 6,7 - 20 - 60 - 180 $\mu g/ml$.

Per quanto riguarda la linea cellulare RAW 264.7, una prima analisi della tossicità degli estratti (vd test MTT 4.1) ha permesso di definire le concentrazioni di estratto da utilizzare nelle prove successive, e individuate

in 7.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ per *Curcuma longa* e in 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ per *Polinacea*. Il piano sperimentale di trattamento cellulare (3.3.1) ha avuto come obiettivo lo studio della modulazione a livello di espressione genica, di specifici geni target coinvolti nel processo infiammatorio.

3.3.1 Test molecolari: real-time PCR

Piano sperimentale

Le cellule sono state portate a confluenza nei piatti di coltura, in seguito sono state incubate con gli estratti di polinacea e curcuma per 1h a 37 °C e 5% CO₂, mentre le cellule di controllo sono state incubate solo con il terreno base. Dopo un lavaggio con PBS, metà dei campioni in ciascuna condizione sperimentale sono stati incubati per 30' con PMA (10^{-7} mol/l), l'altra metà invece non è stata stimolata con PMA. Al termine dell'incubazione i campioni sono stati sottoposti a un ulteriore lavaggio con PBS. I campioni in ciascuna condizione sperimentale sono stati raccolti a 90' e a 240', come è possibile osservare in Tabella 3.3. L'esperimento è stato condotto per tre volte.

I dati di espressione sono stati ottenuti confrontando le cellule trattate con gli estratti rispetto alle cellule di controllo non trattate, nelle due condizioni sperimentali esaminate, e cioè in presenza dello stimolo con PMA e in assenza dello stesso.

3.3.2 Estrazione di RNA da cellule RAW 264.7

Le cellule, a seguito del trattamento con gli estratti e della stimolazione con PMA, sono state lisate e raccolte direttamente nel piatto di coltura aggiungendo 1 ml di reagente TRIZOL ogni 10 cm^2 di superficie del piatto utilizzato.

In seguito, per eseguire l'estrazione, in ogni eppendorf contenente il campione d'interesse, sono stati aggiunti 0.2 ml di cloroformio per ogni ml di TRIZOL utilizzato, il tutto è stato posto in agitazione per qualche secondo ed incubato per 3' a RT.

Dopo aver centrifugato per 20' a 4 °C a 13000 rpm, la soluzione si è separata in due fasi, una fase organica e una acquosa dove è rimasto esclusivamente RNA. È stata dunque prelevata la fase acquosa, facendo attenzione a non toccare l'interfaccia per evitare contaminazioni da DNA e proteine, e trasferita in un nuovo tubo.

Per far precipitare l'RNA, sono stati aggiunti 0.5 ml di isopropanolo ogni

N°	Gruppo	Incubazione	PMA	Camp. 90'	Camp. 240'
1	ctrl	terreno base	✓	✓	
2	ctrl	terreno base	✓	/	✓
3	ctrl	terreno base	/	✓	
4	ctrl	terreno base	/	/	✓
5	polinacea	terreno base + estratto polinacea	✓	✓	
6	polinacea	terreno base + estratto polinacea	✓	/	✓
7	polinacea	terreno base + estratto polinacea	/	✓	
8	polinacea	terreno base + estratto polinacea	/	/	✓
9	curcuma	terreno base + estratto curcuma	✓	✓	
10	curcuma	terreno base + estratto curcuma	✓	/	✓
11	curcuma	terreno base + estratto curcuma	/	✓	
12	curcuma	terreno base + estratto curcuma	/	/	✓

Tabella 3.3: Piano sperimentale di trattamento della linea cellulare RAW 264.7 con Curcuma e Polinacea.

✓= sì; /= no

ml di TRIZOL usato. I campioni poi sono stati posti in agitazione e sono stati incubati per 4 h a -20°C . Dopo centrifugazione di 30' a 13000 rpm a 4°C , l'isopropanolo è stato eliminato. Il pellet è stato lavato con 200 μl di EtOH al 100% e con 200 μl di EtOH al 75%. Infine i campioni sono stati centrifugati per 10' a 13000 rpm a 4°C , l'etanolo è stato eliminato e il pellet risospeso in 20 μl di H_2O sterile priva di RNasi.

3.3.3 Trattamento con DNasi

Per eliminare dal campione di RNA isolato le contaminazioni derivanti dalla presenza di DNA, si esegue un trattamento con DNasi. Si è utilizzata un'endonucleasi isolata dal pancreas di bovino, l'Amplification grade DNaseI (Sigma), in grado di digerire DNA a singolo o doppio filamento in oligo- o mononucleotidi.

Utilizzando solo materiale privo di RNasi, si realizza una mix composta dal campione di RNA in 8 μl di acqua, 1 μl di Buffer di reazione 10 X (contenente 1 ml di Tris-HCl 200 mM, pH 8,3, MgCl_2 20 mM) ed 1 μl di Amplification Grade DNaseI (1 unità/ μl in 50% di glicerolo, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10mM CaCl_2 , 10mM MgCl_2). Dopo aver agitato delicatamente le provette, esse devono essere incubate per 15 minuti a temperatura ambiente per la digestione.

Per bloccare la reazione viene aggiunto 1 μl di Stop Solution (EDTA 50 mM), la quale, legando gli ioni calcio e magnesio, inattiva la DNaseI.

È importante aggiungere la Stop Solution prima del trattamento al calore, per prevenire l'idrolisi dell'RNA da parte degli ioni magnesio e calcio.

È seguita un'incubazione a 70°C per 10 minuti per denaturare sia la DNaseI che l'RNA. I campioni sono stati mantenuti in ghiaccio durante la manipolazione e conservati a -80°C .

3.3.4 Retrotrascrizione

Prima della retrotrascrizione l'RNA è stato sottoposto a lettura allo spettrofotometro (Nanodrop, Thermo Scientific, Delaware USA) per valutarne la quantità presente e le contaminazioni, l'integrità è stata invece verificata tramite corsa elettroforetica in gel d'agarosio all'1%. La retrotrascrizione è stata realizzata per ogni replica biologica su 2000 ng di RNA totale usando la trascrittasi inversa Improm-II (Promega, Milan Italy).

L'RNA totale con 1 μl oligo(dT)18 primers (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ MBI Fermentas, Italy) e acqua priva di nucleasi a un volume finale di 20 μl , è stato incubato a 70°C per 5 minuti in un termociclatore PTC-100 (MJ Research Inc. Waltham, MA USA). E' stata poi aggiunta una mix costituita da 4 μl di

buffer per la trascrittasi inversa Improm-II (5X Promega, Milan Italy), 1,2 μ l MgCl₂ (50mM), 1 μ l di trascrittasi inversa Improm-II e 1 μ l di dNTP (10mM). L'incubazione è proceduta a 37 °C per 90 minuti e infine a 94 °C per 5 minuti. Si è assunto di ottenere una concentrazione finale di cDNA di 50 ng/ μ l.

3.3.5 Primer design

I primer per le successive q-PCR sono stati disegnati utilizzando il programma Primer3 (v. 0.4.0) e sono stati ottimizzati per specificità, temperatura di melting, analizzando la possibilità che potessero formare strutture secondarie, dimeri di primer e la stabilità dell'appaiamento con la sequenza target.

3.4 Test *in vivo*

3.4.1 Prova di alimentazione su cani sani

Allo scopo di valutare l'azione *in vivo* degli estratti di Curcuma longa ed Echinacea angustifolia, è stata allestita una prova di alimentazione su soggetti sani.

Gli animali sono stati messi a disposizione da tre allevamenti e da un centro di addestramento privati, e dal "Rifugio del cane" dell'ENPA di Udine. Per questa prova sono stati utilizzati un alimento base e 2 alimenti nutraceutici, ciascuno contenente l'alimento base e l'estratto vegetale d'interesse come integratore.

Sono dunque stati costituiti tre gruppi, un gruppo di controllo a cui è stato somministrato l'alimento base, e i due gruppi dei trattati con gli alimenti nutraceutici contenenti Curcuma longa (4mg/kg PV al giorno) o Echinacea angustifolia (1,2 mg/kg PV al giorno).

Il gruppo di controllo (ctrl) e il gruppo polinacea (dal nome commerciale dell'estratto di Echinacea angustifolia) erano composti da 7 soggetti, invece il gruppo curcuma (trattato con Curcuma longa) era composto da 6 soggetti. L'età, il sesso e la razza dei soggetti sottoposti alla prova, sono riportati in Tabella 3.4.

Gli animali sono stati sottoposti a due prelievi di sangue effettuati prima dell'inizio del trattamento (giorno 0 - T0) e alla fine dello stesso (giorno 60 - T60). I campioni di sangue sono stati prelevati dalla vena cefalica con il PAXgene Blood RNA System (PreAnalytiX, Switzerland),

Gruppo	Età	Sesso	Razza
ctrl	4	F, I	Pastore tedesco
ctrl	3	F, I	Pastore tedesco
ctrl	2	F, I	Setter
ctrl	9	M, I	Pastore tedesco
ctrl	7	F, I	Setter
ctrl	2	F, I	Setter
ctrl	2	F, I	Setter
polinacea	3	F, I	Setter
polinacea	4	F, I	Setter
polinacea	4	F, I	Setter
polinacea	4	F, I	Setter
polinacea	5	F, I	Setter
polinacea	5	M, I	Meticcio
polinacea	11	M, C	Meticcio
curcuma	3	F, I	Setter
curcuma	6	F, I	Setter
curcuma	6	F, I	Setter
curcuma	6	F, I	Setter
curcuma	4	F, I	Setter
curcuma	15	F, C	Meticcio

Tabella 3.4: Caratteristiche dei soggetti sottoposti alla prova alimentare.
F=femmina, M=maschio, C=castrato, I=intero

l'RNA è stato estratto seguendo il protocollo della ditta produttrice in seguito descritto.

La modulazione dell'espressione genica dovuta alla somministrazione degli estratti, è stata valutata in specifici geni target utilizzando la q-PCR.

3.4.2 Prova di trattamento su cani affetti da osteoartrite

I cani in esame sono stati visitati per rilevare la presenza di osteoartrite o di altre malattie, per ciascun animale è stata eseguita l'anamnesi riportante la condizione di salute dei soggetti e una valutazione dettagliata dell'apparato muscolo scheletrico.

A tal scopo sono state manipolate le articolazioni, e il grado di zoppia è stato classificato con un punteggio da 1 a 5 (dove 5 indica le peggiori condizioni). In questo modo sono stati selezionati 18 cani, 12 dei quali affetti da osteoartrite e 6 sani. I 12 cani malati sono stati suddivisi in maniera casuale in due gruppi costituiti da 6 elementi ciascuno, le caratteristiche dei soggetti sono riportate in Tabella 3.5).

Tra i cani malati, un gruppo di 6 soggetti (animali trattati-CURCUMIN), è stato trattato per 20 giorni due volte al giorno con curcumina (4 mg/kg di peso corporeo), in forma di fitosoma (CURCUVET[®], Indena Spa, Milan, Italy).

Un secondo gruppo di 6 cani (controllo positivo) ha ricevuto una somministrazione di farmaci anti-infiammatori non steroidei (NSAID, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs) per lo stesso periodo di tempo (5 mg/kg al giorno di PREVICOX[®], Merial Italia Spa, Milan, Italy).

Il terzo gruppo (controllo negativo-CTRL) è costituito da animali sani e non trattati.

Le caratteristiche dei soggetti sottoposti alla prova e la composizione dei gruppi sperimentali sono riportate in Tabella 3.5. Per ogni gruppo sperimentale sono stati creati tre pool costituiti da due campioni ciascuno. I pool permettono di ridurre la variabilità individuale (Fu W.J. et al., 2010) che costituisce un parametro molto critico, considerato il fatto che gli animali utilizzati nella prova *in vivo* non sono animali da laboratorio, bensì soggetti eterogenei per età, sesso e razza.

I prelievi di sangue sono stati eseguiti prima dell'inizio del trattamento (al T0), e dopo 20 giorni di trattamento (T20). Ciascun proprietario dei cani sottoposti alla prova ha dato il consenso informato.

Gruppo	Età	Sesso	Razza	Pool
CTRL	6	M, C	Segugio Italiano	1
CTRL	5	F, C	Meticcio	1
CTRL	7	F, C	Labrador Retriever	2
CTRL	4	M, C	Meticcio	2
CTRL	9	M, I	Meticcio	3
CTRL	6	F, I	Cirneco dell'Etna	3
NSAID	13	M, I	Pastore Alsaiziano	4
NSAID	13	F, C	Bracco Tedesco	4
NSAID	14	F, C	Pointer Italiano	5
NSAID	9	F, C	Meticcio	5
NSAID	4	M, I	Meticcio	6
NSAID	6	M, I	Pastore Tedesco	6
CURCUMIN	15	F, C	Pointer Italiano	7
CURCUMIN	12	M, I	Segugio Italiano	7
CURCUMIN	11	M, I	Pastore Tedesco	8
CURCUMIN	5	F, C	Segugio Italiano	8
CURCUMIN	13	M, I	Meticcio	9
CURCUMIN	6	M, I	Setter Irlandese	9

Tabella 3.5: Caratteristiche dei soggetti e composizione dei gruppi sperimentali. F=femmina, M=maschio, C=castrato, I=intero

3.4.3 Estrazione dell'RNA da sangue intero di cane

I campioni di sangue sono stati prelevati dalla vena radiale e trasferiti in tubi PAXgene (PAXgene Blood RNA System - PreAnalytiX, Switzerland), e l'RNA è stato estratto seguendo il protocollo della ditta produttrice descritto in seguito (paragrafo 3.4.3).

Un'ulteriore aliquota, destinata alle analisi ematochimiche, è stata raccolta in provette contenenti come anticoagulante Li-eparina. Le analisi ematochimiche sono state effettuate presso il laboratorio di analisi dell'Istituto di Zootecnica dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza.

Protocollo di purificazione dell'RNA totale da sangue, con PAXgene Blood RNA tubes

I campioni di sangue, dopo il prelievo, sono stati mantenuti in incubazione nei PAXgene Blood RNA Tubes a temperatura ambiente ($15 - 25^{\circ}\text{C}$) per almeno 2 ore.

Se i PAXgene Blood RNA Tubes vengono conservati a $2 - 8^{\circ}\text{C}$ o -20°C o -70°C dopo la raccolta, prima di iniziare la procedura di purificazione dell'RNA, è necessario riportare i campioni a temperatura ambiente e mantenerli a temperatura ambiente per 2 ore.

I tubi sono stati centrifugati per 10' a $4000 \times g$, in seguito è stato rimosso il surnatante e il pellet è stato risospeso in 4 ml di acqua priva di RNasi. Per favorire la risospensione del pellet, il tutto è stato miscelato con il vortex. E' seguita un'altra centrifugazione di 10' a $4000 \times g$ e poi è stato rimosso ed eliminato tutto il sovrnatante.

Sono stati aggiunti al pellet così ottenuto 500 μl di tampone di risospensione, poi agitati fino alla completa dissoluzione del pellet.

Il campione è stato trasferito in una provetta da 1,5 ml, in cui sono stati aggiunti 300 μl di tampone di legame e 40 μl di proteinasi K. Il tutto è stato miscelato per 5 secondi, e in seguito è stato incubato a 55°C per 20 minuti.

Il lisato è stato trasferito direttamente nella colonna PAXgene Shredder posta in una provetta di reazione da 2 ml e centrifugato per 3 minuti a $13000 \times g$.

Il sovrnatante della frazione eluita è stato trasferito in una nuova provetta da 1,5 ml senza interferire con il pellet nella provetta di reazione.

Sono stati poi aggiunti 350 μl di etanolo (96–100 %, grado di purezza p.a.), miscelati su vortex e centrifugati (1-2 secondi a $500 - 1000 \times g$).

Il campione (700 μl alla volta) è stato trasferito in una spin column PAX-

gene RNA posta in una provetta e centrifugato per 1 minuto a $8000 \times g$. Il liquido eluito è stato eliminato e il procedimento descritto è stato ripetuto con il campione rimanente.

Nella colonna per centrifugazione PAXgene RNA sono stati aggiunti 350 μ l di tampone di lavaggio 1, con successiva centrifugazione (1 minuto a $8000 \times g$). La miscela di incubazione DNasi I (80 μ l) è stata depositata direttamente sulla membrana della colonna PAXgene RNA e lasciata agire a temperatura ambiente ($20 - 30^\circ\text{C}$) per 15 minuti.

Sono seguiti tre distinti passaggi di lavaggio con i tamponi di lavaggio del kit, il primo con 350 μ l di tampone di lavaggio 1, il secondo e il terzo con 500 μ l di tampone di lavaggio 2. L'eluizione dell'RNA totale è stata ottenuta ponendo 20 μ l di H_2O direttamente sulla membrana della colonna PAXgene RNA, incubando 2-3 minuti a temperatura ambiente e centrifugando per 1 minuto a $8000 \times g$ per eluire l'RNA.

La fase di eluizione descritta sopra è stata ripetuta due volte utilizzando 20 μ l di H_2O e la stessa provetta da 1,5ml.

L'RNA così ottenuto è stato denaturato per 5 minuti a 65°C in bagnetto. Dopo l'incubazione i campioni di RNA ottenuti sono stati raffreddati immediatamente in ghiaccio e conservati a -80°C .

La concentrazione dell'RNA è stata quantificata allo spettrofotometro (Nanodrop Thermo Scientific, Delaware USA). L'integrità dell'RNA è stata invece valutata per mezzo dell'osservazione dell'RNA ribosomiale 18S e 28S dopo corsa elettroforetica su gel d'agarosio.

DNA-microarray

L'analisi di espressione genica è stata fatta utilizzando un array (Agilent Technologies Italia S.p.A., Milan, Italy) contenente 44000 geni di *Canis familiaris*.

Informazioni più dettagliate sulla piattaforma utilizzata sono disponibili sul sito

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GLP11214>

Per ciascun gruppo sperimentale sono stati preparati tre pool di campioni, ciascuno contenente 2 individui (repliche biologiche) scelti in modo casuale all'interno dello stesso gruppo sperimentale (vd Tabella 3.5).

L'RNA totale (500-1000 ng) è stato marcato prima dell'ibridazione con il kit Quick Amp Labelling Kit one colour (Agilent# 5190-0442).

Le slide Agilent 4x44K Canine Expression Microarray (AMADID 15607) vengono ibridizzate, lavate e poi scansionate su uno scanner Agilent Microarray.

Nel nostro caso è stato utilizzato un sistema single-channel microarray detto anche one-color microarray, dove i dati di intensità di ciascuna sonda indicano il livello relativo di ibridazione del target marcato. I dati grezzi ottenuti corrispondenti ai valori di intensità di ciascun gene depositato sulle slide, vengono corretti eliminando il rumore di fondo, dovuto a diversi fattori tecnici. Il confronto del livello di espressione dello stesso gene in due diverse condizioni sperimentali, necessita dell'allestimento di due separate ibridazioni.

Si è dunque proceduto con la normalizzazione dei dati per poter confrontare tra loro i dati ottenuti nei diversi array. La normalizzazione è stata eseguita con il metodo del quantile (Bolstad et al., Bioinformatics, 2003).

3.4.4 Analisi statistica dei dati

L'analisi dei dati è stata eseguita calcolando il logaritmo in base 2 dei gruppi trattati (FANS e Curcuma), rispetto ai controlli. I log-ratio dei geni sono stati sottoposti ad analisi della varianza con il modello one way ANOVA del software TMeV 4.7, ponendo come fattore fisso il trattamento. Sono stati considerati significativi i geni differenzialmente espressi fra i trattamenti con un p-value $<0,05$.

I geni differenzialmente espressi così ottenuti sono stati sottoposti a data mining, e cioè all'ultima fase dello studio, che prende in considerazione il ruolo biologico dei geni individuati. Esistono numerosi strumenti bioinformatici che permettono di indagare la funzione dei geni e i processi biologici nei quali sono implicati, in questo caso è stato utilizzato il Software IPA (Ingenuity Systems) utilizzando il cut-off del logratio di $\pm 0,6$. Inoltre, l'analisi IPA ha permesso di allocare i geni ai processi biologici, alle pathway e ai network, ottenendo mappe di espressione genica basate sulle funzioni e sulle interazioni molecolari per ciascuno dei trattamenti.

3.4.5 qRT-PCR analysis

I geni che sono risultati sovra o sottoespressi sono stati sottoposti a validazione tramite Real Time PCR.

Per disegnare le sequenze dei primer è stato usato il software Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000) come già descritto precedentemente.

La retrotrascrizione è stata eseguita per ogni replica biologica con 2000 ng di RNA totale usando la trascrittasi inversa Improm-II (Promega, Milan Italy).

L'RNA totale con 1 μ l oligo(dT)18 primers (0,5 μ g/ μ l MBI Fermentas,

Italy) e acqua priva di nucleasi a un volume finale di 20 μ l, sono stati incubati a 70 °C per 5 minuti in un termociclatore PTC-100 (MJ Research Inc. Waltham, MA USA). Poi è stata preparata una mix con 4 μ l di buffer per la trascrittasi inversa Improm-II (5X Promega, Milan Italy), 1,2 μ l MgCl₂ (50mM), 1 μ l of Improm-II Reverse Transcriptase e 1 μ l di dNTPs (10mM), è stata aggiunta alla reazione e incubata a 37 °C per 90 minuti e infine a 94 °C per 5 minuti. Si è assunto di ottenere una concentrazione finale di cDNA di 100 ng/ μ l.

Per ottimizzare le condizioni di PCR e calcolare le efficienze di reazione, la fluorescence baseline e la threshold di ciascun gene, sono state allestite delle curve standard con i pool dei campioni di cDNA in analisi, a diverse concentrazioni. I valori d'espressione dei geni target sono stati normalizzati utilizzando il gene beta-actina (ACTB), che è costitutivamente espresso (Robinson et al., 2007).

Le reazioni di Real-time PCR sono state allestite per ciascuna replica biologica in triplicato usando la mix Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Milan Italy). I geni di cui si è valutato il livello di espressione per la validazione dell'esperimento di microarray sono IL8, IL18, PTGS1, PTGS2, TNF, TLR4, THBS4 and MAPK14. I geni di controllo amplificati in parallelo sono 18S and MRPS7. Per queste reazioni sono state preparate delle mix contenenti 1 μ l di cDNA, 9.5 μ l di H₂O, 1 μ l di ciascun primer e 12.5 μ l di 2X Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG ad ottenere un volume di reazione finale di 25 μ l. La concentrazione di cDNA e la molarità dei primer è stata diversa per ciascun gene ed è stata determinata con le rette standard prima di allestire le reazioni di real-time PCR.

Il protocollo di amplificazione ha previsto 45 cicli (1 secondo a 95 °C, 30 secondi alla temperatura di annealing specifica, 30 secondi a 72 °C) in un termociclatore spettrofluorometrico per piastre a 96 pozzetti (DNA Engine Opticon 2; MJ Research, Inc. Waltham, MA USA).

Per ogni reazione di PCR, per confermare che ci fosse un singolo prodotto di PCR, è stata analizzata la curva di melting per ogni prodotto di amplificazione. Il livello di espressione di ciascun gene target in ciascun gruppo sperimentale è stato analizzato con il metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Bustin, 2000; Pfaffl, 2001), dove $2^{-\Delta\Delta C_t}$ rappresenta la differenza di espressione tra un dato gene target tra il T20 e il T0. Più precisamente, il $\Delta\Delta C_t$ è stato calcolato per ogni gruppo come $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{tj} - \Delta C_{t0}$, dove j è il valore del pool al T20 e 0 è il valore del pool al T0. Il valore di espressione in n-fold di un dato gene target è stato calcolato come $\log_2 (2^{-\Delta\Delta C_t})$ (Bustin, 2000; Livak and Schmittgen, 2001).

Capitolo 4

Risultati e discussione

4.1 Prove *in vitro*

4.1.1 Tossicità cellulare

Le prove di tossicità degli estratti di *Curcuma longa* ed *Echinacea angustifolia*, effettuate per mezzo dei test di vitalità cellulare (MTT), sono state condotte sulle linee cellulari Chang liver e RAW 264.7, e su popolazioni pure di neutrofili isolati da sangue ovino.

La scelta dello studio della tossicità degli estratti sulla linea cellulare Chang liver, peraltro raccomandata da varie linee guida (Clemmedson C, et al. 1996), è dovuta al fatto che il fegato è il sito principale del metabolismo dei farmaci, e molti enzimi in esso coinvolti mostrano il massimo livello di espressione e di attività catalitica negli epatociti. Questo modello cellulare è dunque il più comune per la valutazione della citotossicità e del metabolismo dei composti oggetto di studio.

La linea cellulare RAW 264.7 è costituita da macrofagi murini, che rappresentano una componente fondamentale del sistema immunitario. Questo modello cellulare *in vitro* viene comunemente utilizzato per lo studio degli effetti dell'infiammazione sui processi cellulari, o per l'identificazione di nuovi composti ad azione anti-infiammatoria, e la sua diffusione sta aumentando molto, come dimostra l'abbondanza di articoli scientifici pubblicati negli ultimi 5 anni (Tweedie D et al., 2009).

I neutrofili costituiscono uno dei principali componenti cellulari del sistema immunitario innato e per questo costituiscono un modello cellulare adeguato per valutare alcuni parametri funzionali correlati con le proprietà antinfiammatorie e immunomodulatorie degli estratti naturali in esame.

Il grafico MTT mostra l'andamento della vitalità cellulare rispetto alla concentrazione di estratto utilizzato nel trattamento.

La vitalità relativa a ciascuna concentrazione esaminata è stata ottenuta convertendo in percentuale i dati grezzi di assorbanza delle cellule trattate con gli estratti, rispetto alle cellule di controllo non trattate; in ascissa è stata riportata in ordine crescente la concentrazione degli estratti. L'estratto di Curcuma è stato somministrato alle concentrazioni di 2.8, 7.4, 20 e 54 µg/ml (in figura riportate come 1, 2, 3, 4 rispettivamente); la Polinacea invece è stata somministrata alle concentrazioni di 6.7, 20, 60 e 180 µg/ml (in figura riportate come 1, 2, 3, 4 rispettivamente).

Come si può osservare in Figura 4.1, gli estratti in esame non interferiscono significativamente sulle curve di vitalità relative alle Chang liver e alle RAW 264.7, .

Una valutazione complessiva della citotossicità degli estratti sulla linea cellulare RAW 264.7 ha permesso di identificare una concentrazione adeguata di estratto da utilizzare successivamente nelle prove *in vitro*, per la valutazione dei livelli di espressione in geni target coinvolti nel processo infiammatorio.

La curva di vitalità dei neutrofili ovini, riportata in Figura 4.2, evidenzia un maggior tasso di tossicità nelle cellule trattate con Curcuma longa. Il trattamento con l'estratto di Curcuma ha comportato una diminuzione della vitalità dei neutrofili all'aumentare della concentrazione di estratto somministrato. Una diminuzione significativa della vitalità cellulare con un $p\text{-value} < 0.005$ è stata osservata fra la concentrazione 3 e 4 (20 e 54 µg/ml rispettivamente), mettendo in luce una particolare tossicità dell'ultima concentrazione di estratto sulle cellule.

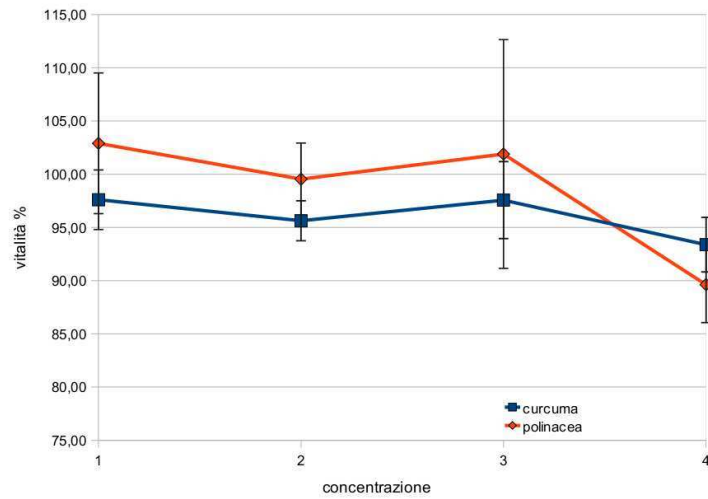
Il trattamento con Polinacea invece non ha determinato una modulazione significativa della vitalità dei neutrofili.

4.1.2 Test di funzionalità

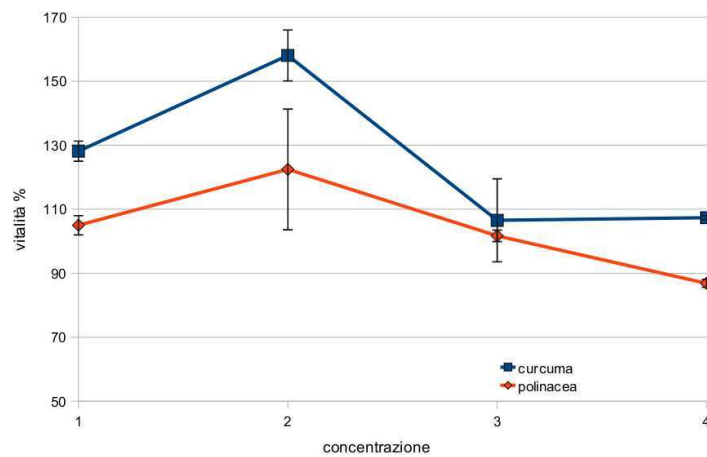
La capacità di adesione e la produzione di superossidi di neutrofili ovini, costituiscono dei validi parametri funzionali correlati con le proprietà antinfiammatorie e immunomodulatorie degli estratti naturali in esame. La capacità dei neutrofili di aderire all'endotelio microvascolare e ai componenti della matrice extracellulare e di produrre radicali liberi derivati dall'ossigeno è considerata essenziale nella risposta infiammatoria e nel sistema di difesa dell'ospite fagocitosi-dipendente.

Una volta raggiunto il sito d'infezione, i neutrofili rispondono fagocitando gli elementi estranei, rilasciando enzimi e proteine contenute nei granuli e producendo specie reattive dell'ossigeno (ROS).

I ROS sono generati da diversi meccanismi intracellulari, sebbene il meccanismo principale, riferito allo scoppio respiratorio (respiratory burst) dei



(a) Chang liver



(b) RAW 264.7

Figura 4.1: Effetto degli estratti di Curcuma e Polinacea sulla vitalità cellulare di (a) Chang liver e (b) RAW 264.7. In ascissa è riportata in ordine crescente la concentrazione degli estratti, la vitalità relativa a ciascuna concentrazione esaminata è stata ottenuta convertendo in percentuale i dati grezzi di assorbanza delle cellule trattate con gli estratti, rispetto alle cellule di controllo non trattate.

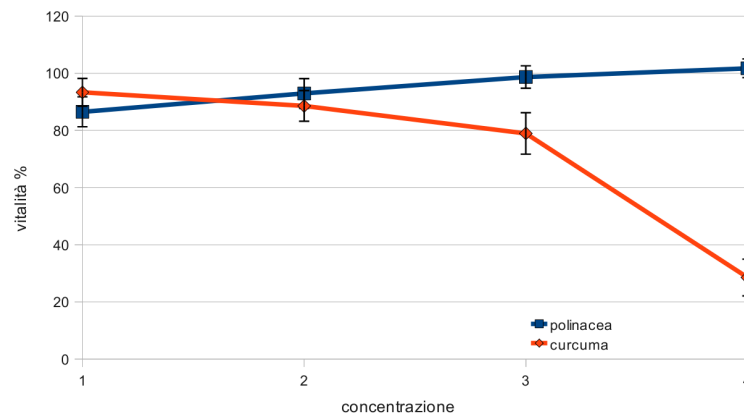


Figura 4.2: Effetto degli estratti di Curcuma e Polinacea sulla vitalità cellulare di neutrofilo ovini. In ascissa è riportata in ordine crescente la concentrazione degli estratti, la vitalità relativa a ciascuna concentrazione esaminata è stata ottenuta convertendo in percentuale i dati grezzi di assorbanza delle cellule trattate con gli estratti, rispetto alle cellule di controllo non trattate.

neutrofili, si basa sull'assemblamento e sull'attivazione della NADPH ossidasi che catalizza la riduzione univalente dell'ossigeno molecolare O_2 in O_2^- .

Le figure 4.3 e 4.4 in seguito riportate descrivono la modulazione del tasso di adesione cellulare e di produzione di superossidi, in neutrofili trattati con gli estratti di Curcuma e Polinacea, e stimolati per l'infiammazione con PMA (Sartorelli et al., 2000; Tung JP et al., 2009).

Test di adesione

Il grado di adesione cellulare relativo a ciascuna concentrazione esaminata, è stato ottenuto convertendo in percentuale i dati grezzi di assorbanza delle cellule trattate con Curcuma e Polinacea, rispetto alle cellule di controllo; in ascissa è riportata in ordine crescente la concentrazione degli estratti.

Il trattamento con Curcuma comporta una progressiva diminuzione dell'adesione dei neutrofili ovini all'aumentare della concentrazione di estratto somministrata. Una differenza significativa nel livello di adesione è stata osservata fra il punto 2 ed il punto 3 ($p < 0.05$), e fra il punto 3 ed il punto 4 ($p < 0.005$).

Il trattamento con Polinacea invece non ha influito significativamente sull'adesione cellulare; infatti il parametro considerato si è mantenuto mediamente costante a tutte le concentrazioni di estratto utilizzate.

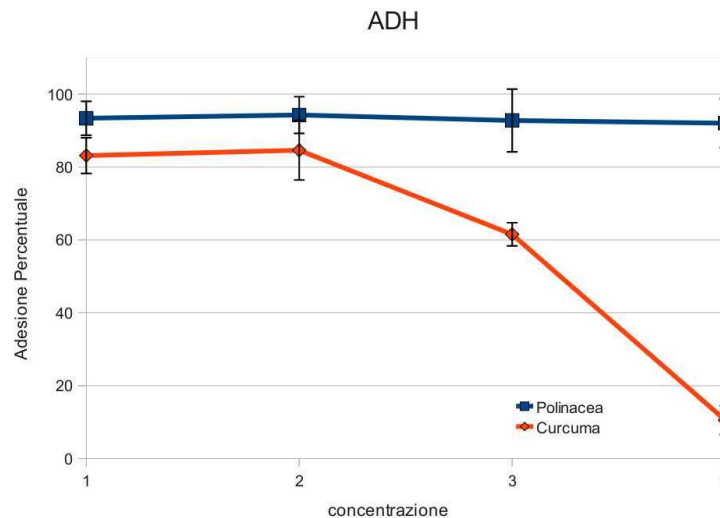


Figura 4.3: Effetto degli estratti di Curcuma e Polinacea sull'adesione cellulare in neutrofili ovini stimolati per l'infiammazione. In ascissa è riportata in ordine crescente la concentrazione degli estratti, in ordinata l'adesione percentuale, ottenuta convertendo in percentuale i dati grezzi di assorbanza delle cellule trattate con gli estratti rispetto alle cellule di controllo non trattate.

Test di produzione di superossidi

Il test della superossido dismutasi mette in relazione il numero di moli di anione superossido prodotto dai neutrofili, espresso in percentuale rispetto alle cellule di controllo, con la concentrazione di estratto utilizzata.

Osservando l'andamento della curva dei neutrofili trattati con la Curcuma, si può notare una diminuzione di produzione di superossidi tra il punto 1 e 2, e poi un marcato aumento fra il punto 2 ed il punto 3 ($p < 0.05$). Segue un'ulteriore diminuzione altamente significativa ($p < 0.005$) fra il punto 3 ed il punto 4.

Il trattamento con la Polinacea determina una diminuzione della produzione di superossido, sia dal punto 1 al punto 2, che dal 2 al 3, ed un aumento dal punto 3 al punto finale 4, ma anche in questo caso la modulazione del parametro in esame non risulta statisticamente significativa.

Ponendo a confronto la curva di vitalità e di adesione cellulare, si potrebbe supporre che la diminuzione di adesione cellulare sia dovuta ad una diminuzione della vitalità e non ad un'efficacia reale del trattamento con l'estratto. Tuttavia, il confronto tra le percentuali di cellule vive rispetto alle cellule adese, in particolare alla concentrazione 3 e 4 di estratto, ha evidenziato una differenza nell'andamento delle due curve, a supporto

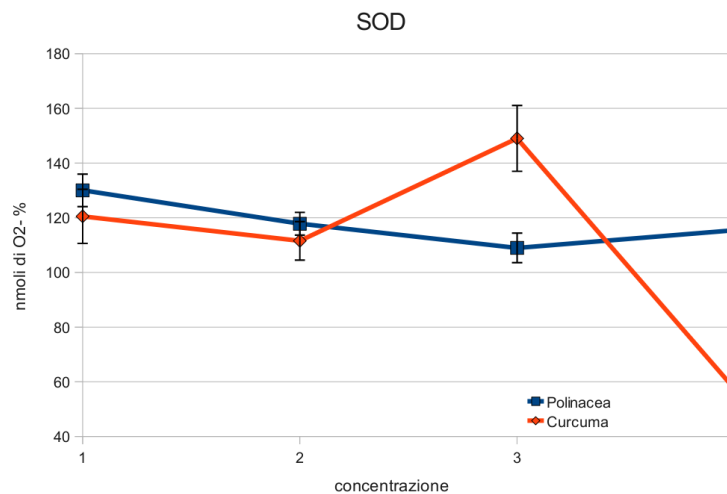


Figura 4.4: Effetto degli estratti di curcuma e polinacea sulla produzione di superossidi in neutrofili ovini stimolati per l'infiammazione. In ascissa è riportata in ordine crescente la concentrazione degli estratti, in ordinata il numero di moli di anione superossido espresso in percentuale rispetto alle cellule di controllo.

dell'ipotesi che la diminuzione dell'adesione sia appunto una conseguenza della natura antiinfiammatoria della Curcuma.

Un confronto analogo può essere fatto per le curve che descrivono i trattamenti con Polinacea: l'aumento della concentrazione di estratto non influisce significativamente sulla vitalità cellulare, infatti anche alla massima concentrazione di estratto utilizzata la vitalità è prossima al 100%. Lo stesso andamento si osserva nella curva di adesione cellulare, in cui non si nota una significativa diminuzione dell'adesione neanche alla massima concentrazione di estratto utilizzata. Questo comportamento potrebbe essere giustificato dalle proprietà immunostimolanti dell'estratto, che si manifestano nell'attivazione dei neutrofili, oppure potrebbe indicare che la Polinacea non ha determinato alcun effetto sui neutrofili.

Sicuramente l'efficacia degli estratti e la loro azione a livello cellulare è anche dipendente dal loro grado di internalizzazione cellulare. Si può ipotizzare che il maggiore livello di citotossicità osservato sui neutrofili trattati con Curcuma rispetto a quelli condizionati con Polinacea, sia dovuta al fatto che l'internalizzazione cellulare è favorita nel caso della presenza del fitosoma, un sistema biologico che permette di aumentare la capacità di questo polifenolo di attraversare le membrane biologiche.

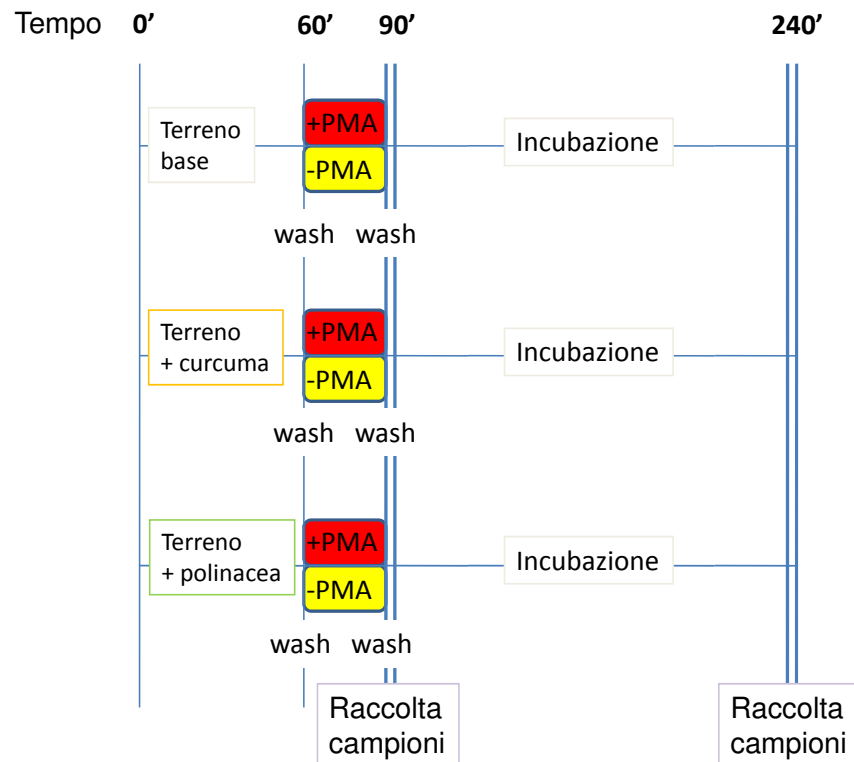


Figura 4.5: Piano sperimentale di trattamento della linea cellulare RAW 264.7 nel gruppo di controllo e nei gruppi trattati con gli estratti di Curcuma e Polinacea.

4.1.3 RAW 264.7

Una prima analisi *in vitro*, per valutare gli effetti degli estratti di Curcuma longa ed Echinacea angustifolia a livello di espressione genica, è stata realizzata sulla linea cellulare RAW 264.7 (Mouse leukaemic monocyte macrophage cell line), in quanto i macrofagi svolgono un ruolo importante nella risposta immunitaria e in caso di malattie infiammatorie.

Le prove *in vitro* sul modello cellulare RAW 264.7 sono state condotte come descritto nel piano sperimentale riportato in Tabella 3.3 e qui descritto nella linea temporale rappresentata in Figura 4.5.

I campioni di controllo sono stati incubati con il terreno di base, mentre per i campioni trattati con Curcuma e Polinacea, le concentrazioni di estratto utilizzate sono state rispettivamente di 7.4 µg/ml e 20 µg/ml. Dopo un'incubazione di 60', per ciascuna condizione sperimentale sono seguiti 30' di stimolazione con PMA (per i campioni indotti all'infiammazione), o

30' di incubazione in terreno senza PMA (per i campioni non indotti). I campioni sono stati raccolti a 90' e a 240', e cioè dopo 1h di condizionamento con gli estratti e 30' di incubazione con o senza PMA, e dopo 150' dalla prima raccolta.

Gli istogrammi riportati (Figure 4.6 e 4.7) descrivono l'andamento dell'espressione genica di IL-1 β , NF- κ B e TNF α , geni marker dello stato infiammatorio, a 90' e a 240'.

Il PMA è sia un attivatore diretto di NF- κ B (Heike, 1999; Sen and Baltimore, 1986a), sia uno stimolatore della funzione di "respiratory burst", e dunque dello stress ossidativo (Tung et al., 2009), che determina un aumento delle citochine proinfiammatorie per mezzo dell'attivazione di NF- κ B (Grimble, 1998).

In Figura 4.6 e in Figura 4.7, è possibile osservare l'effetto dell'estratto di Curcuma e Polinacea sulla modulazione del livello di espressione genica di IL-1 β , NF- κ B e TNF α .

L'esperimento è stato ripetuto per tre volte e i dati di espressione sono stati ottenuti confrontando le cellule trattate con gli estratti rispetto alle cellule di controllo non trattate, nelle due condizioni sperimentali esaminate, e cioè in presenza dello stimolo con PMA e in assenza dello stesso. I valori in ordinata sono riportati come $\log_2 (2^{-\Delta\Delta Ct})$.

In Figura 4.6 (a), si può osservare che a 90' c'è una sovra-espressione dei geni esaminati, dovuta probabilmente a un effetto sinergico del PMA e dell'estratto di Curcuma, sulla stimolazione delle cellule. L'effetto del trattamento si apprezza al tempo 240', in cui si assiste a una sotto-regolazione di IL-1 β ($p = 0,054$), e a una significativa sotto-espressione di NF- κ B e di TNF- α ($p < 0,05$). La Figura 4.6 (b) evidenzia che, in assenza dello stimolo con PMA, a 90' si assiste a una sottoregolazione non significativa di IL-1 β e NF- κ B, mentre si ha una sovraregolazione di TNF- α , a 240' NF- κ B viene sovraregolato probabilmente a causa di un'attivazione operata da TNF- α . In Tabella 4.1 sono riportati i valori medi ottenuti nelle tre repliche biologiche trattate con l'estratto di Curcuma, l'errore standard e la significatività della modulazione dell'espressione genica tra i due tempi. I dati sono riportati per entrambe le condizioni sperimentali, e cioè in presenza e in assenza dello stimolo con PMA.

La stessa analisi può essere condotta per Polinacea. In Figura 4.7 vengono presentati gli effetti dell'estratto nella modulazione dei tre geni target. Anche in questo caso in (a) si osserva come, dopo un'iniziale sovraregolazione dell'espressione dei tre geni a 90', la Polinacea determini a 240'

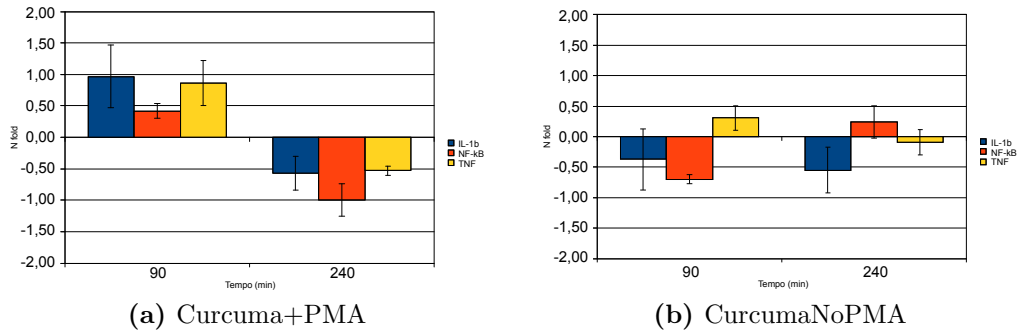


Figura 4.6: Modulazione dei livelli di espressione genica di IL-1 β , NF- κ B e TNF α operata dall'estratto Curcuma.

	tempo	Media	Err. St.	sign.
Curcuma+PMA				
IL-1 β	90'	0,966	0,498	0,054
	240'	-0, 570	0,272	
NF- κ B	90'	0,420	0,115	0,007
	240'	-0,992	0,258	
TNF	90'	0,866	0,362	0,019
	240'	-0,530	0,072	
CurcumaNOPMA				
IL-1 β	90'	-0,371	0,498	0,790
	240'	-0,548	0,370	
NF- κ B	90'	-0,697	0,079	0,026
	240'	0,245	0,262	
TNF	90	0,306	0,206	0,241
	240'	-0,913	0,203	

Tabella 4.1: Media, Errore standard e significatività dei livelli di espressione di IL-1 β , NF- κ B e TNF- α in RAW 264.7 trattate con Curcuma, in presenza e in assenza di PMA.

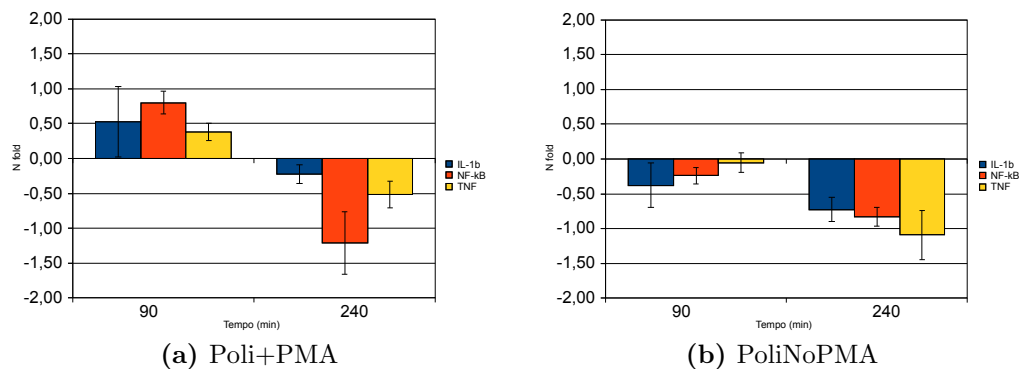


Figura 4.7: Modulazione dei livelli di espressione genica di IL-1 β , NF- κ B e TNF α operata dall'estratto Polinacea.

una diminuzione del livello di espressione di IL-1 β ($p = 0,220$), e determini anche una significativa sotto-regolazione di NF- κ B e di TNF- α ($p < 0,05$). In (b), dove è assente lo stimolo infiammatorio, si verifica comunque un abbassamento dell'espressione di tutti i geni in esame, significativo per NF- κ B ($p < 0,05$).

In Tabella 4.2 sono riportati i valori medi ottenuti nelle tre repliche biologiche trattate con l'estratto di Polinacea, l'errore standard e la significatività della modulazione dell'espressione genica tra i due tempi in presenza e in assenza dello stimolo con PMA.

A supporto dell'ipotesi che la modulazione dell'espressione genica operata da Curcuma e Polinacea, sia dovuta a una effettiva efficacia degli estratti, e non a un decadimento dello stimolo infiammatorio, sono stati esaminati i livelli di espressione dei geni in esame nel gruppo di controllo. Sono stati dunque messi a confronto i livelli di espressione genica del gruppo di controllo trattato con PMA, rispetto a quelli del gruppo di controllo non trattato con PMA, e si è potuto osservare che non solo lo stimolo infiammatorio si mantiene nel tempo, ma tende ad aumentare, determinando un aumento dei livelli d'espressione dei tre geni considerati.

I macrofagi svolgono un ruolo centrale nel mediare diversi fenomeni immunopatologici durante l'infiammazione. I macrofagi attivati da stimoli infiammatori producono una varietà di citochine pro-infiammatorie incluse l'IL-1 β , l'IL-6, il TNF- α e altri mediatori dell'infiammazione come le prostaglandine e l'NO (Gordon S, 2003; Kopydlowski KM et al., 1999).

L'importanza della Curcuma come potente agente immunomodulatorio in linfociti T, linfociti B, neutrofili, cellule NK, in cellule dendritiche e

	tempo	Media	Err. St.	sign.
Polinacea+PMA				
IL-1 β	90'	0,528	0,503	0,220
	240'	-0,228	0,136	
NF- κ B	90'	0,801	0,164	0,013
	240'	-1,212	0,448	
TNF	90'	0,380	0,125	0,017
	240'	-0,516	0,190	
PolinaceaNOPMA				
IL-1 β	90'	-0,379	0,319	0,394
	240'	-0,724	0,171	
NF- κ B	90'	-0,239	0,116	0,030
	240'	-0,829	0,136	
TNF	90	-0,055	0,141	0,052
	240'	-1,092	0,352	

Tabella 4.2: Media, Errore standard e significatività dei livelli di espressione di IL-1 β , NF- κ B e TNF- α in RAW 264.7 trattate con Polinacea, in presenza e in assenza di PMA.

macrofagi è ben documentata (Jagetia GC and Aggarwal BB, 2007).

Diversi studi hanno mostrato la capacità della Curcuma di modulare l'attivazione dei macrofagi; la Curcuma sembra regolare la funzione immunitaria nei topi secondo un andamento dose-dipendente, dove il trattamento con la curcuma induce un aumento della fagocitosi dei macrofagi peritoneali e regola differenzialmente la proliferazione degli splenociti (Li X, Liu X, 2005).

In altri set-up sperimentali l'assunzione di curcuma nella dieta giornaliera per due settimane in ratti, ha portato ad un attenuamento dell'abilità dei macrofagi di generare ROS (Joe B, Lokesh BR, 1994), ad una minor secrezione di collagenasi lisosomiali, elastasi e ialuronidasi (Joe B, Lokesh BR, 2000).

Nel nostro studio l'estratto di Curcuma ha determinato una sottoregolazione di IL-1 β , NF- κ B e TNF- α in macrofagi murini stimolati con PMA. Dati bibliografici a supporto di questo risultato sono in seguito descritti. IL-1 α e IL-1 β sono citochine pleiotropiche coinvolte in diverse risposte immunitarie, nei processi infiammatori e nell'ematopoiesi. Queste citochine sono sintetizzate da molti tipi cellulari, inclusi i macrofagi attivati, i linfociti B stimolati e i fibroblasti, e sono potenti mediatori dell'infiammazione e dell'immunità (Lord PC et al., 1991).

La curcumina può alterare i livelli di espressione e l'attività di una varietà di interleuchine, specialmente IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12, e questo può influenzare la funzione di diversi tipi cellulari in diversi modi. Per esempio in monociti di sangue periferico e in macrofagi alveolari umani stimolati con PMA o LPS, la curcumina riduce i livelli di espressione di IL1 e IL8 secondo un andamento dipendente dalla concentrazione e dal tempo (Chan MM, 1995).

Il TNF- α è la più versatile delle citochine pleiotropiche, e gioca un ruolo cruciale come immunostimolante e come mediatore della resistenza verso molti agenti patogeni. La Curcumina ha effetti su svariati membri della superfamiglia TNF. È stato riportato che può inibire l'espressione di TNF- α indotta da LPS o PMA in cellule dendritiche, macrofagi, monociti, macrofagi alveolari e cellule del midollo osseo endoteliali (Kim GY et al., 2005; Abe Y et al, 1999; Moon DO et al., 2006).

È stato anche provato che in colture di cellule RAW 264.7, il trattamento con curcumina porta alla soppressione dell'espressione di TNF- α indotta da endotossina (Siddiqui AM et al., 2006).

Molti studi indicano che una delle proprietà più importanti della curcumina, responsabile delle sue funzioni immunomodulatorie, è la soppressione dell'attività di Nf- κ B. Nf- κ B è un fattore di trascrizione ubiquitario importante per i suoi effetti pleiotropici, la sua attivazione è di fondamentale importanza nell'immunità innata e adattativa, riveste un ruolo chiave nei processi infiammatori, nelle malattie autoimmuni e nel cancro.

La curcumina blocca l'attivazione di Nf- κ B indotta da TNF- α , PMA o H₂O₂, bloccando la fosforilazione di IKK α (Singh S, Aggarwal BB, 1995).

L'Echinacea angustifolia è stata molto utilizzata per la cura dei raffreddori e delle infezioni respiratorie (Goel V et al, 2004; Barnes J et al., 2005), e si ritiene che la sua efficacia si espliciti attraverso l'interazione con il sistema immunitario (Randolph RK et al., 2003). I meccanismi d'azione a livello molecolare dei fitocostituenti di questa pianta non sono ancora ben definiti, e gli studi volti a chiarire la loro azione immunomodulatoria sono scarsi.

Uno studio condotto da Raduner et al. (2006) su monociti stimolati con LPS, evidenzia che le alchilammidi presenti in Echinacea inibiscono in modo specifico il rilascio di TNF- α e IL-1 β ma non di IL6 e IL8, agendo con un meccanismo molecolare non ancora noto.

Anche Barton R (2005) afferma, sulla base dei dati farmacologici esistenti, che Echinacea non ha solo proprietà immunostimolatorie, ma anche proprietà anti-infiammatorie e antivirali che si esplicano attraverso la riduzione della produzione di NO, TNF- α , IL8 e IL2.

Ad ogni modo, nella prova sperimentale condotta in questo studio, si è potuto osservare che i geni IL-1 β , NF- κ B e TNF- α , vengono sottoregolati a seguito del trattamento con Polinacea. Questo dato suggerisce che la Polinacea può inibire un gruppo di geni che sono associati con l'attivazione dei macrofagi e può dunque influenzare in modo significativo la risposta infiammatoria.

I risultati ottenuti in questa prova evidenziano che sia Curcuma che Polinacea fanno diminuire il livello di espressione di alcuni geni target correlati con l'immunità mediata dai macrofagi (RAW 264.7). Questo andamento suggerisce che Curcuma e Polinacea possiedono proprietà antinfiammatorie, e che sono coinvolte nella regolazione della risposta immunitaria e della difesa correlata a geni che svolgono dei ruoli chiave in diversi processi infiammatori.

Lo screening tossicologico *in vitro* degli estratti è di fondamentale importanza e costituisce uno step necessario per poter procedere con la sperimentazione *in vivo*. I metodi di coltura cellulare sono infatti caratterizzati da una minima richiesta di composti e da una breve durata, condizioni che favoriscono lo screening tossicologico fornendo un buon supporto nella selezione degli estratti più promettenti.

I modelli d'analisi *in vitro* permettono inoltre di bypassare i problemi etici collegati alla sperimentazione *in vivo*, uniformandoci alle Direttive Europee che invitano a ridurre, ridefinire e trovare dei test alternativi alla sperimentazione animale (Wells DJ, 2011).

4.2 Prove *in vivo*

4.2.1 Prova alimentare su cani sani

La prima prova *in vivo* è stata condotta su cani sani, e si è sviluppata in un periodo di tempo di sessanta giorni. Questa prova alimentare è stata allestita allo scopo di valutare l'effetto di diete integrate con gli estratti vegetali di Curcuma e Polinacea, sull'espressione di specifici geni target dell'infiammazione. I prelievi ematici dai soggetti in esame sono stati effettuati al tempo 0 (TO), cioè prima dell'inizio della prova, e al tempo 60 (T60), cioè dopo 60 giorni di alimentazione con il mangime base (per il gruppo di controllo), e con i due mangimi integrati (per i gruppi polinacea e curcuma).

In Figura 4.8 sono stati riportati gli istogrammi relativi ai livelli di espressione di NF- κ B, IKB (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor), IL8 e TNF rispettivamente nel gruppo di

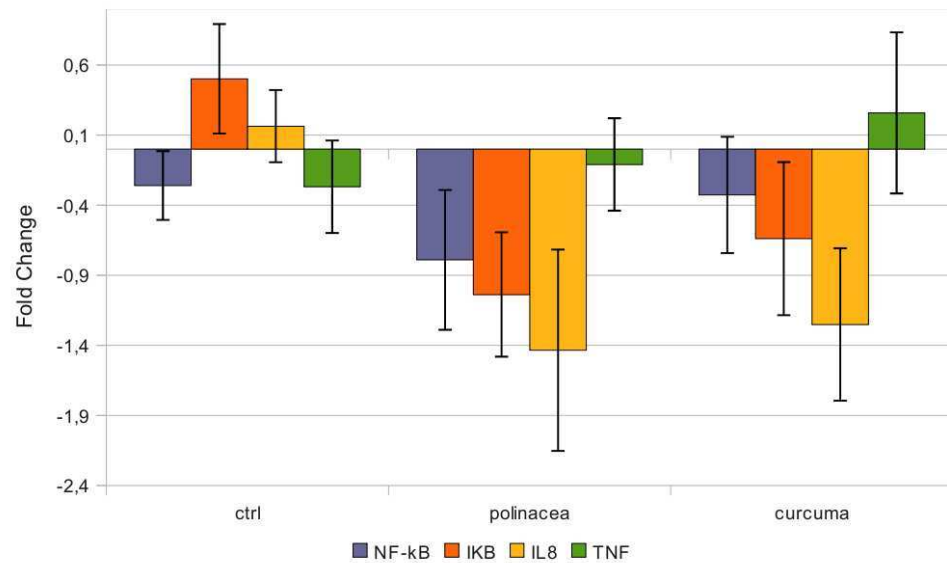


Figura 4.8: Modulazione dei livelli di espressione di NF- κ B, IKB, IL8 e TNF nei tre gruppi sperimentali.

controllo, nel gruppo dei trattati con polinacea e nel gruppo dei trattati con curcuma. Ciascun valore è stato ottenuto rapportando i valori medi di espressione dei soggetti dello stesso gruppo al T60, rispetto ai valori di espressione al T0 (espressi in $\log_2 (2^{-\Delta\Delta C_t})$).

In Tabella 4.3 sono stati riportati i dati relativi alla media e all'errore standard dei valori di espressione di NF- κ B, IKB, IL8 e TNF- α nei tre gruppi sperimentali. Il valore di significatività è stato calcolato sulla differenza tra i livelli di espressione genica nei due gruppi di soggetti trattati con Polinacea e Curcuma, rispetto al gruppo di controllo non trattato. La variabilità interindividuale e il numero ridotto dei soggetti in esame hanno determinato un elevato errore standard associato ai livelli di espressione genica.

La modulazione dei geni target nei gruppi trattati rispetto al gruppo alimentato con il mangime base, è visualizzabile in Figura 4.9

È stato osservato che l'estratto di Polinacea determina una significativa ($p < 0.05$) sotto-espressione di IKB e IL8 e che anche i soggetti alimentati con il supplemento di Curcuma mostrano una sottoregolazione dei livelli di espressione di IKB e IL8 ($p < 0.1$), mentre in entrambi i gruppi sperimentali NF- κ B e TNF non risultano modulati significativamente.

Uno dei fattori limitanti nell'utilizzo dei mangimi nutraceutici potrebbe essere la scarsa biodisponibilità degli estratti vegetali, che dovrebbe essere

	Media	Err. St.	sign.
Controllo			
NF- κ B	-0,259	0,390	
IKB	0,502	0,446	
IL8	0,164	0,529	
TNF	-0,269	0,400	
Polinacea			
NF- κ B	-0,790	0,390	0,350
IKB	-1,038	0,446	0,026
IL8	-1,435	0,529	0,048
TNF	-0,110	0,400	0,782
Curcuma			
NF- κ B	-0,327	0,422	0,908
IKB	-0,639	0,481	0,100
IL8	-1,252	0,572	0,087
TNF	0,259	0,432	0,383

Tabella 4.3: Media, Errore standard e significatività dei livelli di espressione genica dei gruppi sperimentali in esame.

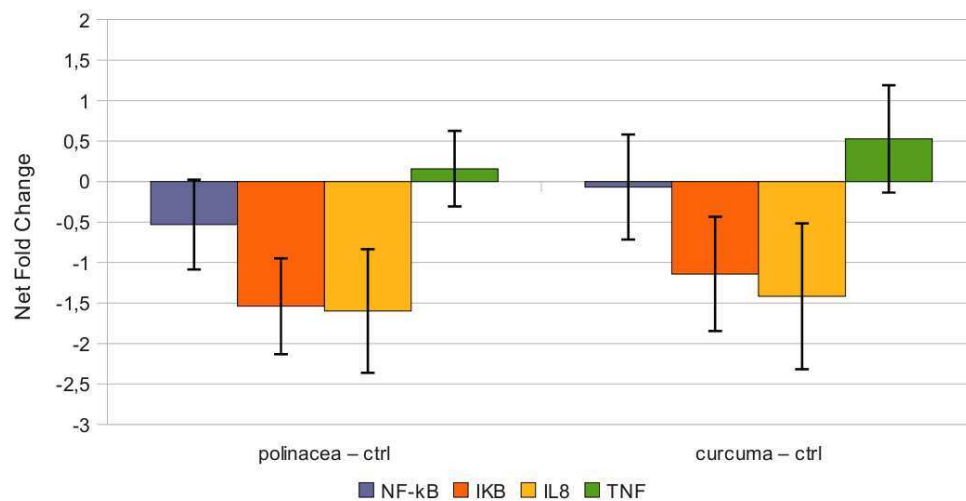


Figura 4.9: Modulazione dei livelli di espressione genica nei gruppi trattati con polinacea e curcuma, rispetto al gruppo di controllo.

Indicatori della funzionalità epatica e renale						
		T0		T60		sign.
		media	ds	media	ds	
Controllo						
Aspartato-amino-transferasi (AST/GOT)	U/l	38.30	11.17	38.23	7.58	n.s.
Glutammato piruvato transaminasi (ALT/GPT)	U/l	36.92	6.51	34.95	7.80	n.s.
Glutamil-transferasi (GGT)	U/l	3.73	1.86	3.57	1.32	n.s.
Curcuma						
Aspartato-amino-transferasi (AST/GOT)	U/l	33.55	5.15	36.02	8.70	n.s.
Glutammato piruvato transaminasi (ALT/GPT)	U/l	39.70	14.08	52.02	53.55	n.s.
Glutamil-transferasi (GGT)	U/l	3.58	1.76	3.22	2.01	n.s.
Polinacea						
Aspartato-amino-transferasi (AST/GOT)	U/l	31.74	11.08	35.82	9.66	n.s.
Glutammato piruvato transaminasi (ALT/GPT)	U/l	43.62	23.15	42.26	18.53	n.s.
Glutamil-transferasi (GGT)	U/l	4.11	2.37	2.86	1.24	n.s.

Tabella 4.4: Indicatori della funzionalità epatica e renale.

Range di normalità dei parametri considerati: AST/GOT 0-50 U/l; ALT/GPT 10-100 U/l; GGT 0-7 U/l.

attentamente valutata mediante prove di assorbimento e farmacocinetica. L'efficacia dei fitoterapici assunti tramite l'alimentazione può essere a volte limitata dallo scarso assorbimento a livello intestinale, soprattutto per quanto riguarda talune molecole bioattive contenute nei complessi chimici estratti dalle piante, come ad esempio i flavonoidi, che ne rappresentano la maggioranza, di cui fanno parte anche i polifenoli. Inoltre lo studio è stato condotto su soggetti sani, è ciò limita la possibilità di apprezzare evidenti cambiamenti che invece ci si aspetterebbe nel caso soggetti malati trattati col composto bioattivo in esame.

Allo scopo di valutare la tollerabilità degli alimenti nutraceutici somministrati ai soggetti sottoposti alla prova, sono stati quantificati alcuni indici per la valutazione della funzionalità epatica e renale sia al T0 che al T60. I marcatori del metabolismo epatico possono essere utili per monitorare l'andamento di un processo flogistico o eventualmente gli effetti tossici delle sostanze in esame, in quanto il loro aumento nel sangue, causato da diversi meccanismi, può essere indice di stress o insufficienza d'organo.

La glutammato piruvato transaminasi (ALT) è un enzima appartenente alla classe delle transferasi. L'alanina trasporta nel sangue i gruppi amminici prodotti dal muscolo in seguito alla degradazione delle proteine. In prossimità del fegato, attraverso l'azione dell'alanina transaminasi, cede questi gruppi al glutammato. Quest'ultimo successivamente li rilascia sotto forma di ammoniaca, che entra nel ciclo dell'urea. L'alanina transaminasi è comunemente misurata in clinica veterinaria per stabilire la salute del fegato. Elevati livelli di ALT possono essere sintomo di danni epatici, epatiti alcoliche o virali, insufficienza cardiaca congestizia, problemi ai dotti biliari, infezioni da mononucleosi o miopatie.

La gamma-glutamyl-transferasi (GGT) e la transaminasi glutammico - ossalacetica (AST), sono 2 enzimi intracellulari localizzati per lo più nel cuore e nel fegato, in condizioni normali sono presenti in bassissime quantità nel sangue, ma vengono liberati in quantità maggiori in seguito a stress o a danni cellulari e tissutali.

L'analisi di questi parametri ha contribuito a far emergere uno degli aspetti più importanti derivati da questo studio, e cioè la mancanza di tossicità dei prodotti.

I risultati ottenuti confermano una buona attività antinfiammatoria degli estratti in esame, che si manifesta principalmente nella sotto-regolazione della citochina pro-infiammatoria IL8.

Studi precedenti hanno evidenziato che la Curcuma inibisce, in maniera dipendente dalla dose e dal tempo di trattamento, la produzione dell'interleuchina 8 sui granulociti polimorfonucleati umani, stimolati con PMA o

LPS batterico (Jagetia and Aggarwal, 2007). La natura anti-infiammatoria della Curcuma è stata dimostrata anche mediante esperimenti *in vivo* sui cavalli: tale estratto inibisce la produzione di molte citochine e chemochine tra cui l'IL-8 (Jurenka JS 2009).

Studi condotti mediante cromatografia liquida su animali modello per l'artrite, hanno evidenziato una inibizione della produzione di chemochine e citochine grazie alla somministrazione di Curcumina (Funk JL et al., 2006). I meccanismi attraverso i quali la curcumina induce i suoi effetti anti-infiammatori sono ancora da chiarire completamente. Alcuni studi hanno mostrato che PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) è associato con questa azione anti-infiammatoria. I PPAR appartengono alla superfamiglia dei recettori nucleari e consistono in tre geni che danno origine a tre diversi sottotipi, PPAR- α , PPAR- δ e PPAR- γ . Tra questi il PPAR- γ è la forma più studiata (Jacob A et al., 2007).

Studi condotti su ratti e su cellule RAW 264.7 hanno evidenziato che il trattamento con curcumina determina un aumento dell'espressione di PPAR- γ (Siddiqui et al, 2006). Questa evidenza suggerisce che gli effetti benefici della curcumina siano mediati dalla sovra-regolazione di PPAR- γ , che porta alla riduzione del complesso chinasi I κ B, all'attivazione di JNK e alla riduzione delle vie di segnalazione AP-1 e NF- κ B (Zingarelli et al, 2003), con conseguente soppressione delle citochine pro-infiammatorie.

È stato scelto di studiare l'effetto della Curcuma e di Polinacea sulla modulazione di NF- κ B e del suo inibitore I κ B, perchè NF- κ B svolge un ruolo centrale nelle cellule del sistema immunitario, dal momento che viene rapidamente attivato da un gran numero di stimoli e si comporta come un potente attivatore trascrizionale.

La famiglia di NF- κ B consiste di 5 membri, RelA (p65), RelB, c-rel, p105/p50 (NF- κ B1), p100/p52 (NF- κ B2) (Sharif et al., 2007). Il complesso di NF- κ B è composto di dimeri formati da queste subunità. Da studi *in vitro* si è osservato che nelle cellule in assenza di stimolo proinfiammatorio, NF- κ B è situato nel citoplasma legato ad un membro della famiglia I κ B α , β o ϵ . Tutte le I κ B contengono un dominio di interazione proteina-proteina che trattiene le subunità nel citoplasma (Hayden MS, 2004). Gli stimoli infiammatori attivano la via di segnalazione NF- κ B, questa via è caratterizzata da una rapida fosforilazione e conseguente degradazione ubiquitina-dipendente di I κ B α da parte del proteasoma 26S. La fosforilazione di I κ B avviene per opera del complesso I κ B chinasi (IKK), questo complesso ha tre principali subunità, IKK α , β e γ (anche noto come NEMO) (Hayden MS, 2004). La fosforilazione delle proteine I κ B è operata principalmente da IKK β , che è anche impiegato nella fosforilazione delle

subunità p105 e p50 (Perkins ND et al., 2006). Il meccanismo d'azione della curcumina può essere quello di inibire direttamente l'attività di IKK, prevenendo la fosforilazione e degradazione di I κ B α che manterrà bloccato NF- κ B, oppure quella di inibire IKK down-regolando l'attività della via di segnalazione a monte di IKK (MEKK-1 o NIK NF- κ B inducing kinase) (Pan et al., 2000).

Studi condotti da Singh e Aggarwal (1995) mostrano che la curcuma blocca l'attivazione di NF- κ B indotta sia da TNF che da PMA che da H₂O₂. La comprensione di come la curcuma inibisce l'attivazione di NF- κ B richiede la conoscenza dei meccanismi attraverso i quali i vari induttori attivano questo importante fattore di trascrizione. È stato dimostrato che tutti e tre gli induttori di NF- κ B sopra citati producono intermedi reattivi dell'ossigeno (ROI). Per cui, un'ulteriore ipotesi sul meccanismo d'azione della curcuma, è che agisca attraverso la soppressione della produzione di ROI (Schulze-Osthoff et al., 1993).

Un altro interessante spunto di riflessione che deriva dallo studio di Singh e Aggarwal (1995) è che la formazione del complesso p50/p65 sia impedita dalla sotto-espressione a livello citoplasmatico della subunità p65 di NF- κ B. Dalla loro ricerca emerge che la curcuma non determina una sotto-espressione di p65 ma che ne inibisce la traslocazione al nucleo, più precisamente attraverso l'inibizione della degradazione di I κ B.

Sulla base dei risultati ottenuti nella prova, si è potuto osservare che sia Curcuma che Polinacea determinano una sotto-regolazione di NF- κ B e del suo inibitore I κ B, una possibile spiegazione a ciò è che la sottoregolazione di NF- κ B e la mancanza di uno stimolo pro-infiammatorio, determini una mancanza di trascrizione di I κ B e dello stesso NF- κ B. Infatti, come affermato da Tian (2005) i componenti inibitori della via di segnalazione TNF-IKK-NF- κ sono loro stessi NF- κ B-dipendenti e questo suggerisce che la via NF- κ B si autoregoli con un meccanismo a feedback negativo. Infatti esistono delle proteine nel loop "NF- κ B-I κ B" che vengono espresse da NF- κ B quando questo entra nel nucleo (Han e Brasier, 1997), e che ricatturano e inattivano lo stesso NF- κ B ristabilendo l'omeostasi cellulare. Una di queste è appunto I κ B α che lega selettivamente RelA e viene risintetizzato molto rapidamente con un loop-autoregolatorio ben organizzato (Brasier et al., 2001).

4.2.2 Prova di trattamento di cani affetti da osteoartrite

Una seconda prova *in vivo* è stata allestita per valutare l'effetto dell'estratto di *Curcuma longa* sul trascrittoma delle cellule del sangue del cane (*Canis familiaris*), utilizzando un approccio nutrigenomico.

Si è infatti voluto osservare come la somministrazione dell'estratto di *Curcuma* agisca a livello trascrizionale su tutto il genoma del cane, e si è voluto confrontare la sua efficacia rispetto al trattamento usuale di questa patologia con i farmaci antinfiammatori non steroidei (NSAIDs).

A questo scopo sono stati allestiti tre gruppi sperimentali, un primo gruppo composto da soggetti sani e due gruppi costituiti da soggetti affetti da osteoartrite. Tra i cani malati, un gruppo di 6 soggetti (animali trattati CURCUMIN), è stato trattato per 20 giorni due volte al giorno con curcumina (4 mg/kg di peso corporeo), in forma di fitosoma (CURCUVET®, Indena Spa, Milan, Italy).

Un secondo gruppo di 6 cani (controllo positivo-NSAIDs) ha ricevuto una somministrazione di NSAID (PREVICOX®, Merial Italia Spa, Milan, Italy) per lo stesso periodo di tempo (5 mg/kg al giorno).

I prelievi ematici sono stati effettuati al tempo 0 (TO), e cioè prima dell'inizio della prova, e al tempo 20 (cioè dopo 20 giorni di trattamento).

La modulazione dell'espressione genica è stata analizzata utilizzando un array (Agilent Technologies Italia S.p.A., Milan, Italy) contenente 44000 geni di *Canis familiaris*.

Per ciascun gruppo sperimentale sono stati preparati tre pool di campioni, ciascuno contenente 2 individui (repliche biologiche) scelti in modo casuale all'interno dello stesso gruppo sperimentale.

I pool permettono di ridurre la variabilità inter-individuale che costituisce un parametro molto critico, considerato il fatto che gli animali utilizzati nella prova non sono animali da laboratorio, bensì soggetti eterogenei per età, sesso e razza.

I dati grezzi ottenuti dopo ibridazione dell'RNA su slide Agilent 4x44K Canine Expression Microarray (AMADID 15607), corrispondono ai valori di intensità di ciascun gene depositato sulle slide.

L'analisi dei dati di espressione genica è stata eseguita mettendo a confronto il livello di espressione genica al T0 e al T20, dei gruppi di controllo positivo e del test, costituiti da soggetti malati trattati rispettivamente con NSAIDs e CURCUMIN, rispetto ai gruppi di controllo negativo (CTRL), costituiti da soggetti sani non trattati. I rapporti ottenuti per ciascun gene, sono stati convertiti in \log_2 per assicurare un'omogeneità della varianza.

L'analisi statistica è stata effettuata con il modello ANOVA a una via, uti-

	T0		T20	
	NSAID	CURCUMIN	NSAID	CURCUMIN
Numero totale geni	475	498	173	141
Sovra-espressi	290	271	52	31
Sotto-espressi	185	228	121	110

Tabella 4.5: Geni differenzialmente espressi al T0 e al T20 risultanti dall'analisi IPA con p -value < 0.05 e con log ratio superiore a ± 0.6 . La tabella riporta anche il numero dei trascritti sovra- e sotto-espressi nei gruppi NSAID e CURCUMIN.

lizzando il software open-source MeV (v 4.6- <http://www.tm4.org/mev/>) e ponendo il gruppo come fattore fisso (Saeed et al., 2006),. I geni significativamente ($p < 0.05$) differenzialmente espressi a seguito dell'analisi statistica ANOVA sono risultati 2804.

Una successiva analisi con il programma Ingenuity Pathways Analysis versione 9.0 (Ingenuity Systems, Mountain View, CA, USA) ha permesso di ridurre a 771 i geni significativamente modulati, selezionando i trascritti con un cut-off ± 0.6 del valore di log ratio.

Come riportato in Tabella 4.5, i trascritti differenzialmente espressi prima dei trattamenti (T0) sono risultati 475 e 498 rispettivamente nel gruppo dei trattati con NSAID e nel gruppo dei trattati con Curcumina. Dopo 20 giorni di trattamento, i trascritti differenzialmente espressi sono risultati 173 nel gruppo dei trattati con NSAID e 141 nel gruppo dei trattati con Curcumina.

Il confronto al tempo "0" tra i gruppi sperimentali dei trattati rispetto al controllo negativo non trattato, permette di mettere in luce le condizioni generali di salute degli animali prima dell'inizio della prova, e permette di evidenziare le caratteristiche principali dello stato di malattia. Al T0 infatti ciò che risulta dal confronto fra i gruppi è sostanzialmente la differenza tra i cani malati rispetto ai cani sani (utilizzati come controllo). Al T20 è possibile apprezzare l'effetto della somministrazione di FANS (NSAIDs) e curcumina (CURCUMIN).

I geni differenzialmente espressi sono stati annotati nelle categorie funzionali, per mezzo dell'uso di strumenti che permettono di definirne l'ontologia genica (GO). Nelle Tabelle 4.6 e 4.7 sono riportate le categorie più interessanti correlate con l'osteoartrite comuni al gruppo NSAID e CURCUMIN ($p < 0.001$). Le categorie "inflammatory response", "haematological system development and function" e "connective tissue development and function", sono presenti sia al T0 che al T20, ma il numero dei geni

T0				
	NSAID		CURCUMIN	
	p-Value	Gene	p-Value	Gene
Diseases and Disorders				
Inflammatory response	0.0000589	32	0.0000523	66
Molecular and Cellular Functions				
Cellular movement	0.0000589	28	0.0000740	70
Cellular compromise	0.0015600	20	0.000152	10
Physiological system development and function				
Hematological system development and function	0.0000589	37	0.000198	62
Hematopoiesis	0.0000589	21	0.000257	23
Immune cell trafficking	0.0000589	21	0.000274	42
Connective tissue development and function	0.0002710	26	0.000814	36

Tabella 4.6: La tabella riporta le categorie funzionali più interessanti correlate con l'osteoartrite, comuni al gruppo NSAID e CURCUMIN, con p-value < 0.001 al T0.

T20				
	NSAID		CURCUMIN	
	p-Value	Gene	p-Value	Gene
Diseases and Disorders				
Cancer	0.0008140	57	0.000124	36
Inflammatory response	0.0026600	12	0.000194	15
Molecular and Cellular Functions				
Cellular growth and proliferation	0.0002070	57	0.000125	32
Cell death	0.0002740	29	0.000182	27
Cell cycle	0.0003510	25	0.0000238	21
Physiological system development and function				
Hematological system development and function	0.000198	31	0.000194	23
Tumor morphology	0.0002571	13	0.00000920	15
Cardiovascular system development and function	0.0002741	11	0.000542	19
Connective tissue development and function	0.000814	16	0.000125	16

Tabella 4.7: La tabella riporta le categorie funzionali più interessanti correlate con l'osteoartrite, comuni al gruppo NSAID e CURCUMIN, con p-value < 0.001 al T20.

coinvolti nella risposta infiammatoria e nello sviluppo e funzione del tessuto connettivo, diminuisce drasticamente al T20. Le categorie con funzioni molecolari e cellulari al T0 appartengono alla risposta cellulare a stimoli esterni (“cellular movement” e “cellular compromise”) e al T20 sono coinvolte nel destino cellula (“cellular growth and proliferation”, “cell death” e “cell cycle”).

In Tabella 4.8 si osserva che nel gruppo “NSAID” al T0, i geni significativamente modulati appartengono alle categorie “chemokinesis of neutrophils”, “degranulation of neutrophils”, “transmigration of granulocytes” e “transmigration of neutrophils”. Nel gruppo dei trattati con curcuma, sempre al T0, alcuni geni significativamente modulati appartengono anche alle categorie “migration of bone marrow cells”, “migration of lymphatic system cells” e “phagocytosis of macrophages”. Dopo il trattamento, le annotazioni funzionali, riportate in Tabella 4.9 sono diminuite sia nel gruppo dei trattati con NSAID che con Curcumina, specialmente nell’ambito delle categorie correlate con l’attività dei neutrofili.

L’analisi dei biomarker con IPA permette di identificare i geni candidati sulla base delle caratteristiche biologiche più rilevanti per lo studio, e inoltre consente di evidenziare i meccanismi che legano i potenziali marker con la malattia o il processo biologico d’interesse.

Tra i biomarker così individuati, riportati in Tabella 4.10 dove sono descritte anche le loro relazioni con il processo infiammatorio, se ne distinguono alcuni particolarmente importanti per le loro funzioni, e che risultano sovraespressi al T0 in entrambi i gruppi. Questi geni sono IL18, IL8, S100A8, S100A9, e TNF α . Tra questi solo TNF α risulta sottoespresso al T20 a seguito del trattamento con curcuma, gli altri geni non risultano significativamente sottoespressi (cioè il loro log ratio non risulta ± 0.6).

Il software IPA ha permesso di identificare in entrambi i gruppi 25 vie di segnalazione attive al T0, e 14 attive al T20. Questi network sono coinvolti in numerosi processi fisiologici, inclusi la morte cellulare, danni del tessuto connettivo, disturbi genetici, interazioni e signalling cellulare, metabolismo lipidico, scavenging dei radicali liberi.

Si è cercato dunque di trovare una relazione tra i network così generati e le vie di segnalazione note per mezzo di un’analisi delle vie canoniche di segnalazione. Sono state identificate così due vie che vengono maggiormente influenzate dai trattamenti condotti. La via “TNFRF1 signalling” pathway rappresentata in Figura 4.10 mette in luce che al T0, sia nel gruppo trattato con CURCUMIN che con NSAID, i cani affetti da osteoartrite presentano gli stessi geni significativamente modulati rispetto al gruppo di controllo.

Function annotations	NSAID T0		CURCUMIN T0	
	Up regulated	Down regulated	Up regulated	Down regulated
chemokinesis of neutrophils	CAST, IL8, S100A9, TNF		CAST, IL8, S100A9, TNF	
degranulation of neutrophils	ANXA1, IL8, S100A9, TNF		ANXA1, IL8, PLAUR, S100A9, TNF	
trasmigration of granulocytes	ANXA1, CCL24, CD47, IL8, TLR4, TNF	MYLK3		
trasmigration of neutrophils	ANXA1, CD47, IL8, TLR4, TNF	MYLK3		
migration of bone marrow cells			ANXA1, CD47, HIF1A, HMGB1, IL18, IL8, JAK2, PLAUR, S100A8, S100A9	ITGA2B, MYLK3
migration of lymphatic system cells			ANXA1, CD47, HIF1A, HMGB1, IL18, IL8, JAK2, PLAUR, S100A8, S100A9	FOXC2, ITGA2B, MYLK3
phagocytosis of macrophages			ANXA1, CD47, HMGB1, MAPK14, PXN, TLR4, TNF	APOA2

Tesi di dottorato di Chiara Scaini, discussa presso l'Università degli Studi di Udine
Tabella 4.8: Annotazioni funzionali dei geni sovra- e sotto-espressi nei gruppi NSAID e CURCUMIN al T0.

Function annotations	NSAID T20		CURCUMIN T20	
	Up regulated	Down regulated	Up regulated	Down regulated
immune response of Th1 cells	CTLA4, IL18			
immune response of Th2 cells	CTLA4, IL18			
hematological process	ALOX12, BIRC5, CAST, CDK6, ELF4, F9, GRB2, HOXB7, IL18	ADCYAP1, ADD2, CTLA4, ID3		
regulation of T helper lymphocytes	CTLA4	IL18		
hematopoiesis	BIRC5, CAST, CDK6, ELF4, GRB2, HOXB7, IL18, LTF	ADCYAP1, ADD2, CTLA4, ID3, KIRREL3		
function of T lymphocytes	IL18, STAT5B	CTLA4, SH2D1A		
phagocytosis of macrophages			MAPK14	SCN5A, SERPINE1, TNF

Tabella 4.9: Annotazioni funzionali dei geni sovra- e sotto-espressi nei gruppi NSAID e CURCUMIN al T20.

Gene symbol	Log ratio				Applications
	NSAID		CURCUMIN		
Up-regulation	T0	T20	T0	T20	
BCL6	0.756	-	1.283	-	Diagnosis, Efficacy, Prognosis
HMGB2	1.271	-	1.553	-	
IL18	0.709	0.618	0.793	-	Diagnosis, Efficacy, Prognosis, Response to Therapy, Safety
IL8	0.963	-	0.933	-	Efficacy
LDHA	0.766	-	0.987	-	Diagnosis, Efficacy, Prognosis
LYZ	0.843	-	0.780	-	
S100A8	1.199	-	1.610	-	Diagnosis, Efficacy, Response to Therapy
S100A9	1.404	-	1.843	-	Diagnosis
TNF	0.749	-	1.147	-	Diagnosis, Efficacy, Prognosis, Safety
LTF	-	0.892	-	-	
NR4A1	-	0.748	-	0.747	
ATP6V1B2	-	-	0.860	-	
SOD2	-	-	0.997	1.033	Diagnosis, Disease progression, Prognosis
Down-regulation					
BGLAP	-0.846	-	-0.733	-	Diagnosis, Efficacy, Safety
TNF	-	-	-	-0.647	Diagnosis, Efficacy, Prognosis, Safety
CTLA4	-	-0.689	-	-	Diagnosis, Efficacy, Prognosis
USP13	-	-0.866	-	-0.650	
SMTN	-	-0.657	-	-	
HBEGF	-	-	-	-0.642	Diagnosis, Efficacy
SERPINE1	-	-	-	-0.603	Diagnosis, Efficacy, Response to Therapy, Safety

Tabella 4.10: Geni candidati come biomarker e loro relazioni con il processo infiammatorio.

Tesi di dottorato di Chiara Scaini, discussa presso l'Università degli Studi di Udine

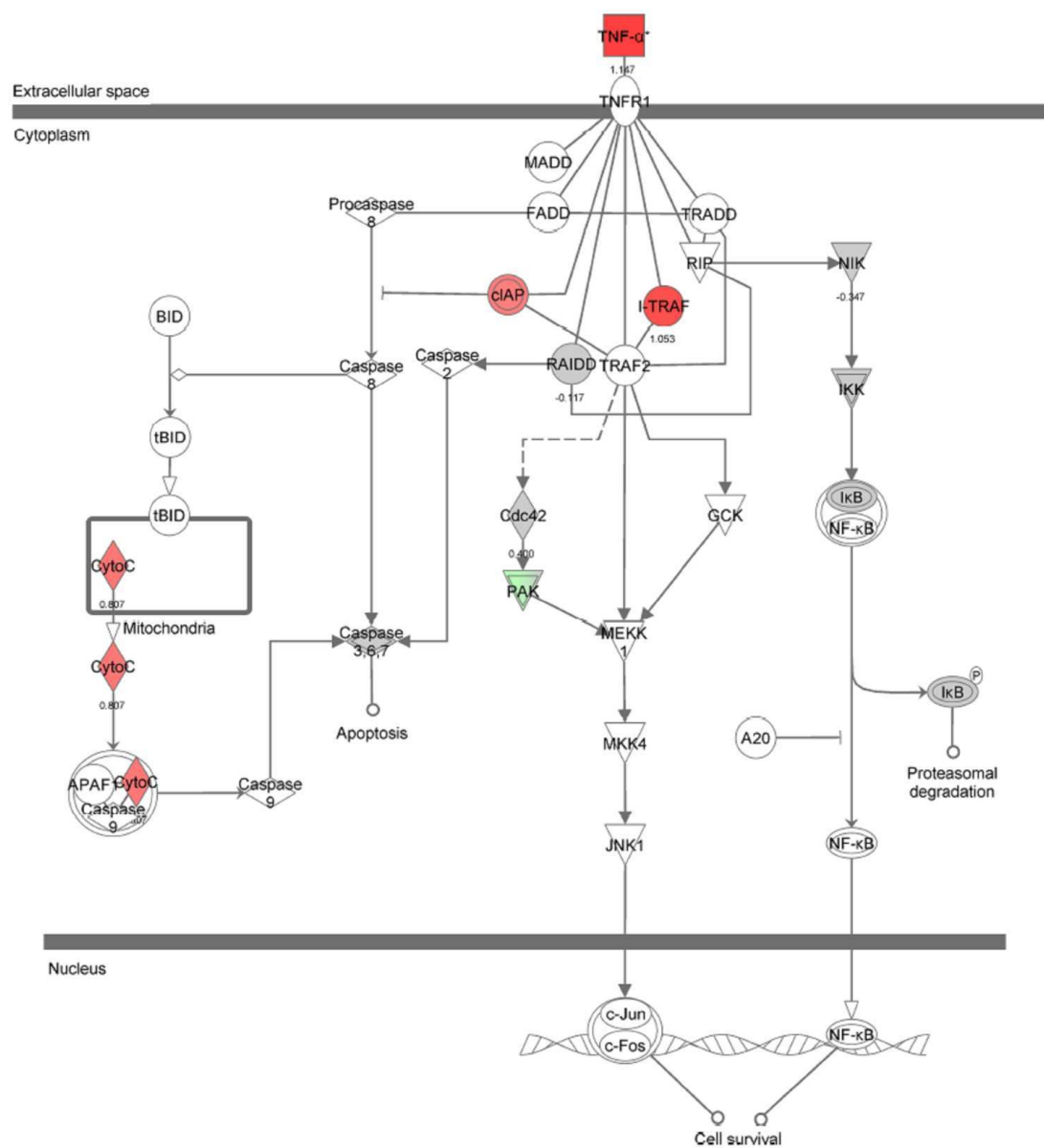


Figura 4.10: “TNRF1 signalling” pathway al T0.

Al T20 invece, come si può osservare in Figura 4.11 e in Figura 4.12, si assiste a una diversa modulazione genica a seguito della somministrazione di CURCUMIN e NSAID rispettivamente. In particolare, a seguito del trattamento con curcuma è stata osservata una sotto regolazione di TNF- α e una sovraregolazione di I κ B, mentre il trattamento con NSAID modula l'espressione dei geni coinvolti senza determinare un aumento di espressione di I κ B.

La seconda via di segnalazione individuata descrive il “ruolo delle citochine nel mediare la comunicazione tra cellule del sistema immunitario” ed è riportata in Figura 4.13 al T0 e in Figura 4.14 al T20. A seguito del trattamento con CURCUMIN viene significativamente sotto-regolata l'espressione di TNF- α , e non risultano più sovra-espressi IL8 e IL18. Il trattamento con NSAID determina una sottoespressione degli stessi geni, ma non modula l'espressione di IL18.

La validazione dei dati di espressione genica ottenuti con IPA, è stata effettuata misurando in real-time PCR il livello di espressione di IL8, IL18, TLR4, MAPK14 e TNF α , presenti all'interno delle categorie funzionali e dei biomarkers individuati. I valori di espressione ottenuti riportati in Figura 4.15 sono consistenti con i valori di espressione rilevati con l'analisi microarray.

Inoltre sono stati analizzati altri due geni: PTGS1 e PTGS2, perchè considerati target rilevanti in caso di infiammazione. I dati ottenuti in real-time PCR confermano i risultati dell'analisi microarray per la maggior parte dei geni più rilevanti, TNF- α , TLR4, IL8, IL18 e MAPK14. L'NSAID utilizzato, Firocoxib, inibisce selettivamente PTGS2, e una simile attività è stata riportata anche per la curcuma (Vane et al., 1996; Anand et al., 2011). Poichè PTGS2 non è stato ritrovato tra i geni significativi a seguito dell'analisi IPA, l'espressione della ciclossigenasi nella sua forma inducibile e costitutiva è stata misurata in real-time PCR. I dati riportati in Fig. 4.16 confermano la funzione inibitoria selettiva della curcumina e dei NSAID, nell'espressione di PTGS2.

L'osteoartrite è una delle cause più comuni di zoppia nei cani. È causata principalmente dal deterioramento della cartilagine articolare, ed è accompagnata da dolore, infiammazione e perdita di movimento dell'articolazione. Il trattamento farmacologico dell'OA è limitato all'uso dei NSAIDs, che però è associato a numerosi effetti collaterali (Innes et al., 2010)

La Curcumina (diferuloilmetano) è un polifenolo naturale derivato dal rizoma di *Curcuma longa*, usato per il trattamento di varie malattie grazie alle sue potenzialità, e che agisce attraverso la via di segnalazione dell'NF κ B

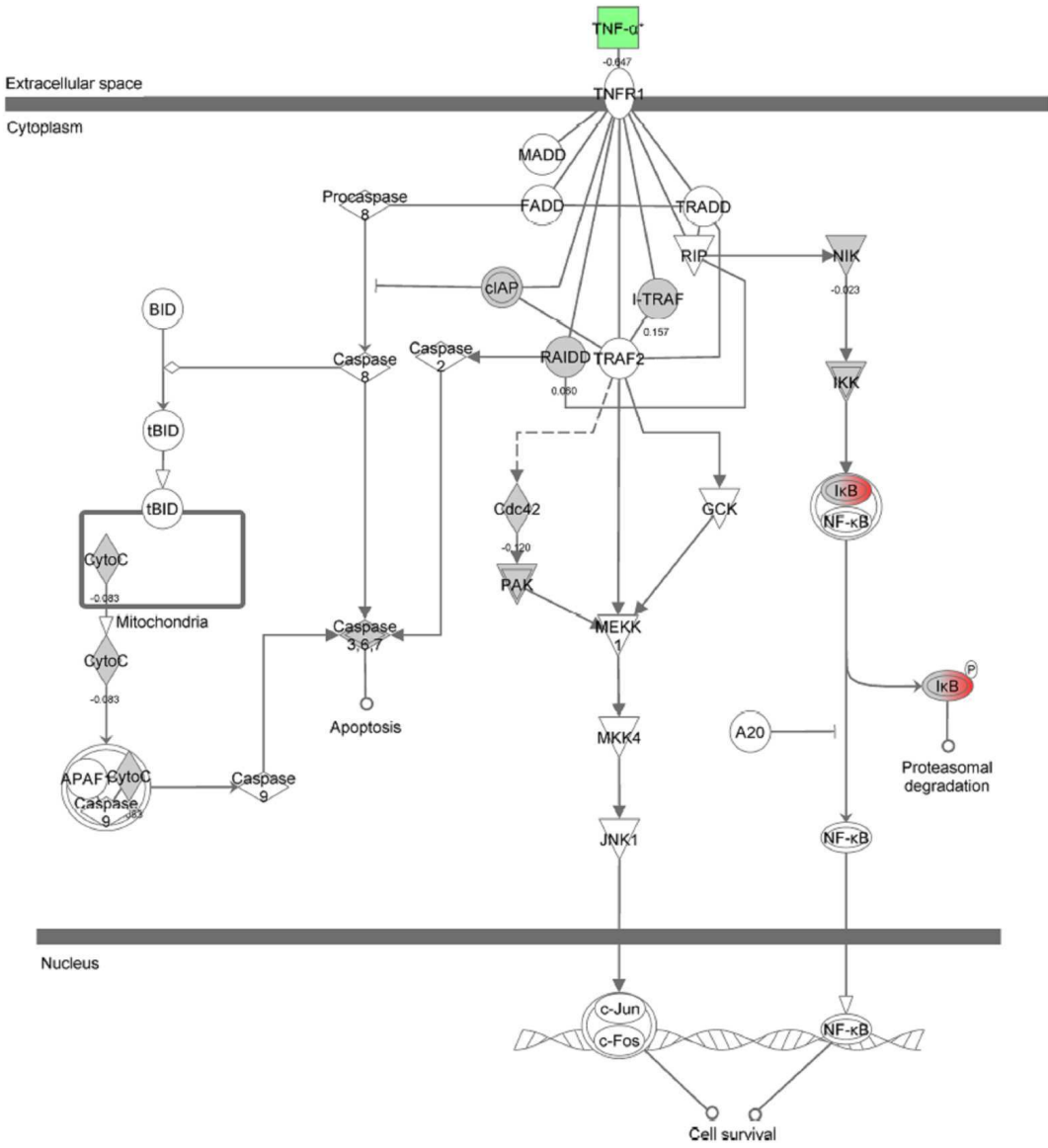
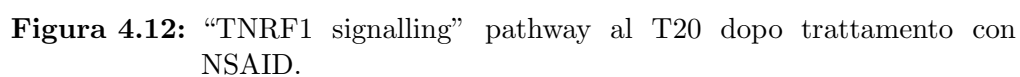


Figura 4.11: “TNRF1 signalling” pathway al T20 dopo trattamento con CURCUMIN.



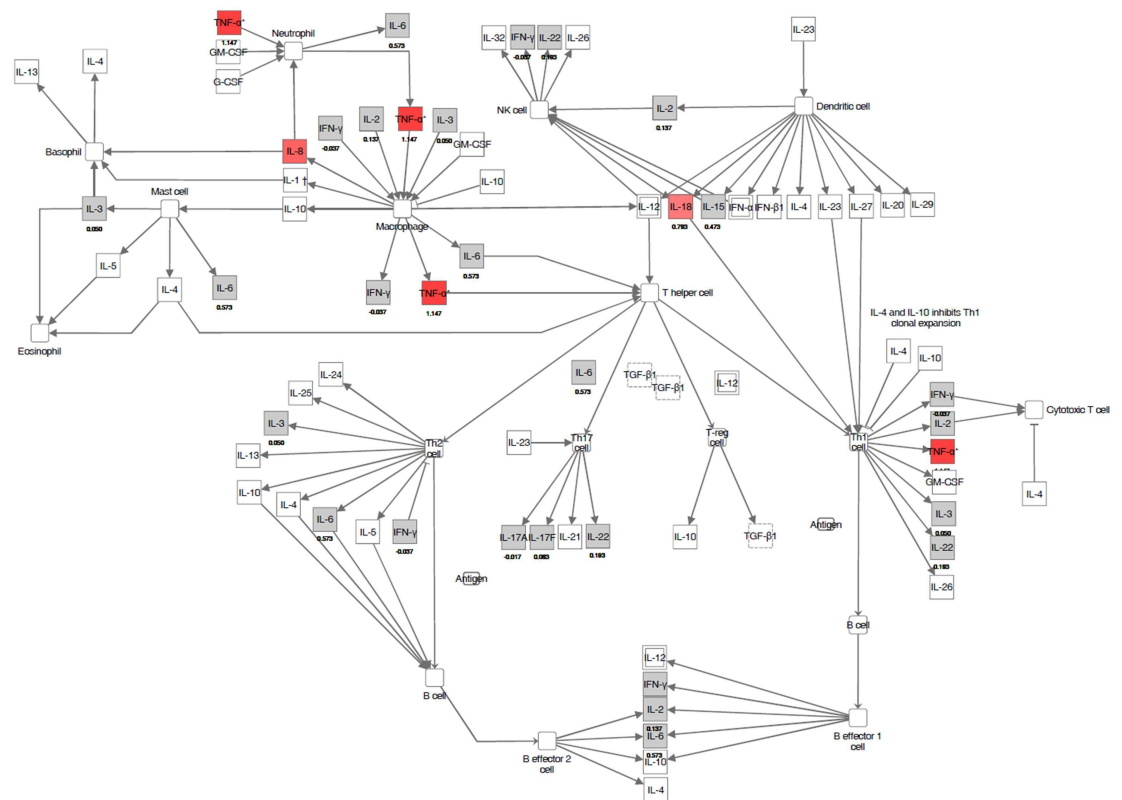


Figura 4.13: Ruolo delle citochine nel mediare la comunicazione tra cellule del sistema immunitario. T0

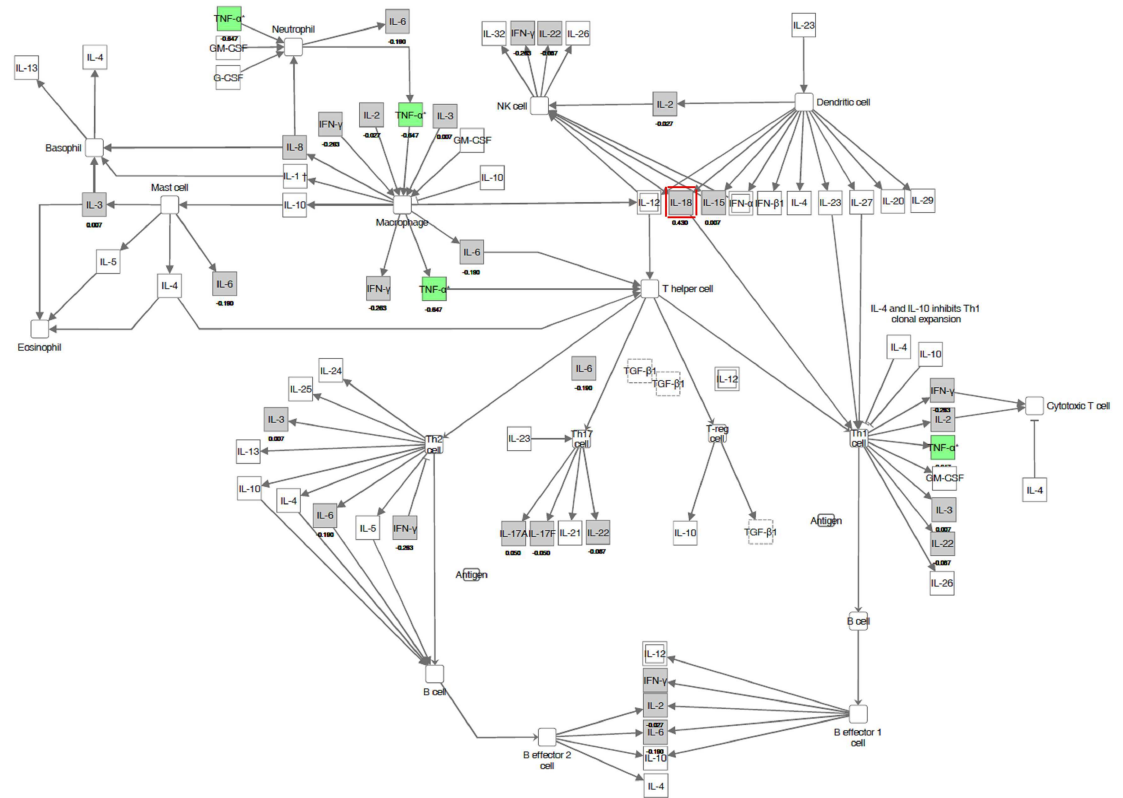


Figura 4.14: Ruolo delle citochine nel mediare la comunicazione tra cellule del sistema immunitario. T20

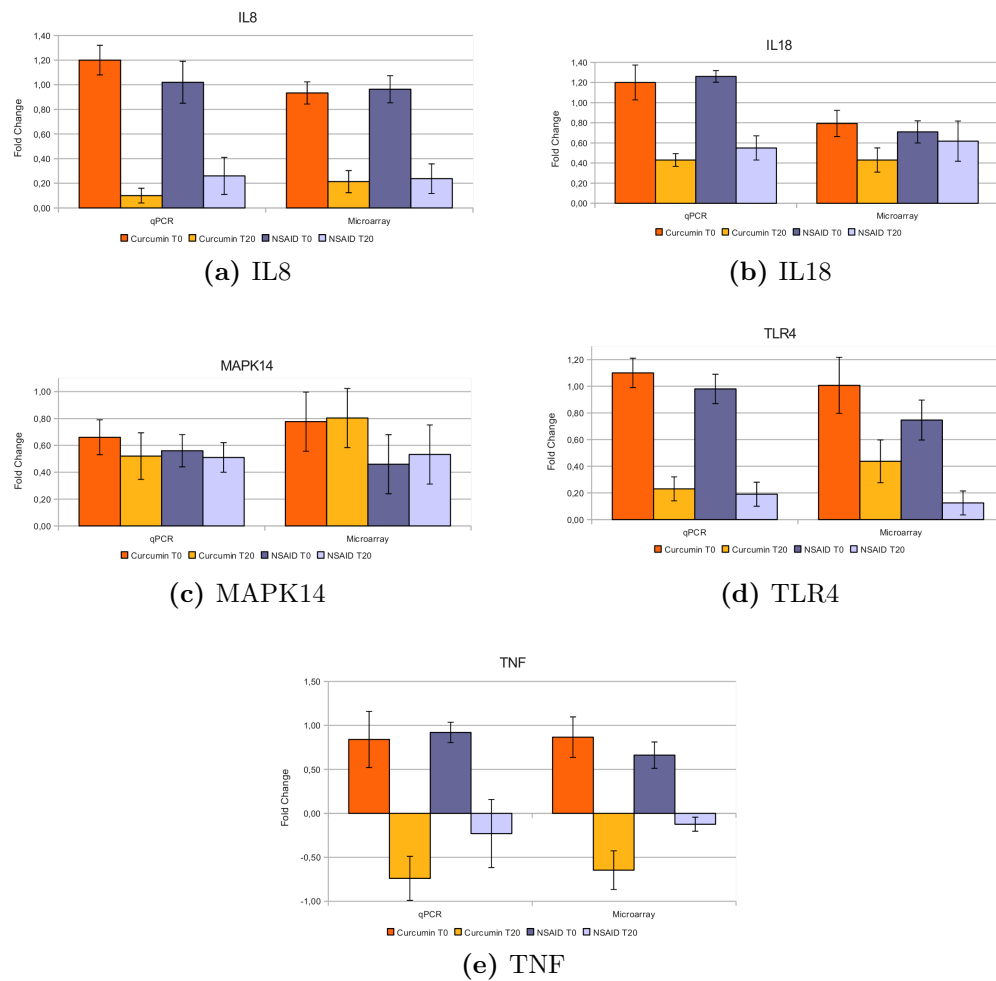


Figura 4.15: Confronto dei livelli di espressione di IL8, IL18, MAPK14, TLR4 e TNF α ottenuti in qPCR e tramite microarray.

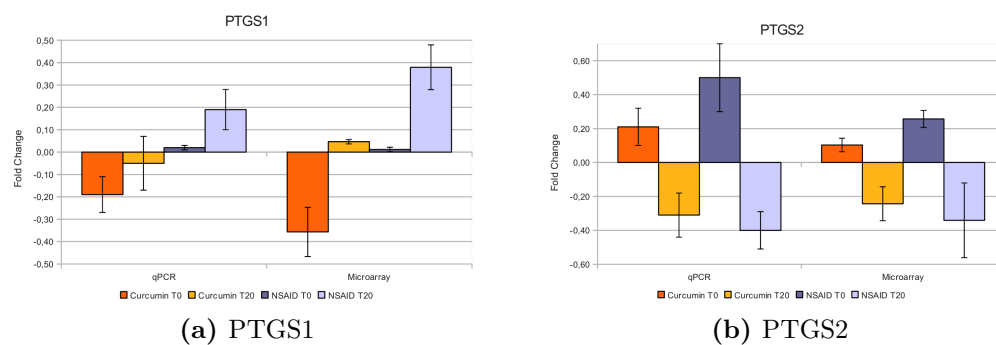


Figura 4.16: Confronto dei livelli di espressione di PTGS1 e PTGS2 ottenuti in qPCR e tramite microarray.

(Bharti et al., 2004; Buhrmann et al., 2011).

Questo polifenolo ha un'attività antiossidante e antinfiammatoria e i suoi effetti positivi sono stati anche evidenziati nel caso di somministrazione *per os* descritta in fattrici affette da OA cronica (Farinacci et al., 2009a). Nonostante Innes et al. (2003) abbiano documentato una diminuzione del dolore e un recupero dei movimenti articolari dopo il trattamento dei cani con la curcuma, non è ancora stata fatta un'analisi di tutto il trascrittoma per capire i meccanismi molecolari alla base di questi effetti nel cane.

Per questo studio sono stati utilizzati campioni di sangue, considerando che le cellule circolanti nel sangue periferico costituiscono un tessuto surrogato che contiene profili trascrizionali correlati con la malattia (Rockett and Burczynski, 2006), evitando pratiche cliniche più invasive come il prelievo del liquido sinoviale o le biopsie del tessuto.

In questo studio si è potuto osservare che nei due gruppi in esame (cani trattati con NSAID e con CURCUMIN), sono stati identificati un numero paragonabile di geni differenzialmente espressi al T0 nei soggetti affetti da osteoartrite (475 NSAID e 498 CURCUMIN), e al T20 (173 NSAID e 141 CURCUMIN), cioè a seguito del trattamento dei soggetti (Fig.4.5). Questi risultati indicano che la curcumina può mimare l'attività antinfiammatoria dei NSAID (Shakibaei et al., 2007).

Dai risultati ottenuti in questo studio si evince che il trattamento con NSAID e CURCUMIN riduce i livelli di espressione di $\text{TNF-}\alpha$, una citochina proinfiammatoria prodotta dai sinoviociti attivati, dai macrofagi e dai condrociti (Fernandes et al., 2002). $\text{TNF-}\alpha$ attiva il fattore di trascrizione ubiquitario $\text{NF-}\kappa\text{B}$, che determina la produzione e di citochine pro-infiammatorie ed enzimi come PTGS2. È stato anche mostrato che la curcumina limita alcuni effetti catabolici di $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ attraverso l'inibizione di $\text{NF-}\kappa\text{B}$ in diversi tipi cellulari (Aggrawal et al., 2004). Al T20 la curcumina determina una sovra-espressione di I κ B (Fig 4.11), che inattiva $\text{NF-}\kappa\text{B}$ sequestrandolo nel citoplasma, senza interferire con la sua fosforilazione. È stato mostrato che il resveratrolo e la curcumina inibiscono la via di trasduzione del segnale di $\text{NF-}\kappa\text{B}$ in condrociti articolari umani, ma in modo diverso (Csaki et al., 2009). Mentre il resveratrolo inibisce l'ubiquitinazione dell'I κ B α fosforilata, e blocca la traslocazione dell' $\text{NF-}\kappa\text{B}$ attivato al nucleo, la curcumina inibisce solo la traslocazione dell' $\text{NF-}\kappa\text{B}$ attivato al nucleo, senza interferire con la fosforilazione. D'altro canto, un target specifico dell'attività della curcumina in linee cellulari tumorali umani è l'inibizione dell'attività di IKK (Anand et al., 2011), una proteina serin/treonin chinasi che fosforila gli inibitori di $\text{NF-}\kappa\text{B}$ portando così alla dissociazione del complesso inibitore/ $\text{NF-}\kappa\text{B}$ e infine alla degradazione del-

l'inibitore. In questo studio è stato osservato solo un aumento del livello d'espressione di I κ B forse perchè il complesso meccanismo di regolazione di NF- κ B potrebbe aver mascherato questa specifica attività della curcumina *in vivo*.

La sotto-regolazione di TNF- α osservata dopo la somministrazione di Curcuma e NSAIDs esercita un ruolo chiave nel controllo dell'espressione di IL8 e IL18 (Fig. 4.14). IL8 è sovraespressa al T0 e sottoespressa al T20 in entrambi i gruppi. López-Armada et al. (2002) hanno osservato una significativa riduzione dei livelli d'espressione di IL8 in conigli con artrite indotta da antigeni, dopo il trattamento con meloxicam e clofenac (NSAIDs). Inoltre, Farinacci et al. (2009b) hanno osservato una forte attività antinfiammatoria del Curcuvet sui neutrofili ovini, e l'inibizione di IL8. L'IL18 è presente ad alti livelli nel siero e nella sinovia reumatoide (Cho et al. 2005; Boraschi and Dinarello, 2006), e in questo studio l'IL18 è overespressa al T0 in entrambi i gruppi, ma solo dopo il trattamento con curcumina viene sottoespressa, con un p-value < 0.05. Questi risultati sono in accordo con lo studio di Okunieff et al. (2006), che ha osservato che la curcumina, somministrata prima o dopo trattamento con radiazioni nel topo, diminuisce significativamente il livello d'espressione delle citochine a risposta precoce inclusa IL18.

S100A9 e S100A8 giocano un ruolo come mediatori pro-infiammatori nell'infiammazione acuta e cronica e stimolano il rilascio di IL8 e l'espressione sulla superficie cellulare di ICAM-1 (Ryckman et al., 2003). La riduzione della loro sovra-regolazione dopo i trattamenti è giustificata dall'attività antinfiammatoria di questi composti.

Il Toll-like receptor-4 (TLR4) esercita un ruolo chiave nell'individuare le componenti microbiche e indurre la risposta immunitaria innata (Youn et al., 2006).

L'attività della curcumina e dei NSAID nella regolazione di TLR4 è consistente con i dati riportati da Youn et al. (2006), che dimostrano che l'assunzione giornaliera di curcumina modula l'attivazione dei TLR e la conseguente risposta immunitaria/infiammatoria, inibendo sia la dimerizzazione indotta da ligando, che quella ligando indipendente di TLR4.

La curcumina contribuisce anche a ridurre i livelli di espressione di geni correlati con la proliferazione dei macrofagi come HBEGF e con l'inibizione della fibrinolisi come SERPINE1.

Questo studio, condotto su cani affetti da osteoartrite, ha messo in evidenza che la curcuma, come già documentato per l'uomo, regola dei target molecolari coinvolti nella risposta infiammatoria. Questi target molecolari

specifici sono correlati con l'inibizione della proliferazione dei macrofagi e la sottoregolazione di $\text{TNF-}\alpha$. Nonostante il limitato numero di soggetti non permetta di trarre delle conclusioni definitive per quanto riguarda l'esito clinico della patologia, si può affermare che la curcumina rappresenta una buona terapia ausiliaria per il trattamento dell'osteoartrite.

Conclusioni

La scelta dei composti è stata fatta sulla base delle loro potenzialità come agenti antinfiammatori e immunomodulatori, da impiegare nella prevenzione e nel trattamento dell'infiammazione cronica, che rappresenta una componente essenziale nella patogenesi di molte malattie correlate con l'invecchiamento, e di molte malattie multifattoriali.

L'interesse nell'approfondimento dell'attività dell'Curcuma *in vivo*, deriva dalle evidenze scientifiche che la pongono come un buon agente antiossidante, antinfiammatorio e antitumorale. La Curcuma infatti attiva vie di segnalazione multiple che modulano l'omeostasi dei sistemi biologici. Per quanto riguarda le proprietà di Echinacea angustifolia, le conoscenze sono più frammentarie, in particolare i meccanismi d'azione a livello molecolare dei fitocostituenti di questa pianta non sono ancora ben definiti. Risulta dunque interessante lo studio dei suoi effetti nella modulazione degli stati infiammatori.

Lo studio dell'attività degli estratti di Curcuma longa ed Echinacea angustifolia, condotto nell'arco del periodo di dottorato, ha permesso di valutare gli effetti antinfiammatori a livello cellulare e molecolare, che questi composti possono avere sia in modelli cellulari, sia *in vivo*.

I risultati ottenuti *in vitro* hanno mostrato che sia Curcuma che Polinacea determinano una diminuzione del livello di espressione di alcuni geni target correlati con l'immunità mediata dai macrofagi. Questo andamento suggerisce che gli estratti di Curcuma e Polinacea possiedono proprietà antinfiammatorie, e che sono coinvolti nella regolazione della risposta immunitaria e della difesa correlata a geni che hanno dei ruoli chiave in diversi processi infiammatori.

La prova *in vivo* ha permesso di valutare la tollerabilità degli alimenti nutraceutici somministrati, per mezzo della quantificazione di alcuni indici per la valutazione della funzionalità epatica e renale. I risultati d'espressione genica ottenuti hanno confermato una buona attività antinfiammatoria degli estratti in esame, che si manifesta principalmente nella sotto-regolazione della citochina pro-infiammatoria IL8.

Lo studio condotto *in vivo* su cani affetti da osteoartrite ha permesso infine di effettuare uno screening degli effetti della curcuma sull'intero genoma del cane, e ha evidenziato che la curcuma regola i target molecolari della risposta infiammatoria come già osservato nell'uomo. Alcuni target molecolari specifici della curcuma sono correlati con l'inibizione della proliferazione dei macrofagi, con la sotto-regolazione di TNF- α e con l'attivazione della fibrinolisi, caratteristiche che rendono la curcuma un buon supporto complementare per il trattamento dell'osteoartrite.

Il limitato numero di soggetti sottoposti al trattamento non consente di trarre delle conclusioni definitive per quanto riguarda l'attenuazione dei sintomi della malattia, ed è necessario un maggior numero di soggetti per validare l'uso della curcuma per il trattamento delle osteoartriti del cane.

In conclusione l'approfondimento delle proprietà dei composti naturali a livello molecolare e cellulare, ha la potenzialità di permettere di individuare i target farmacologici dei fitocomplessi d'interesse, di valutarne l'attività globale ed aprire una strada per l'identificazione dei biomarker più significativi nella modulazione del processo infiammatorio.

Bibliografia

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Immunologia cellulare e molecolare. Padova Piccin Editore. 1994

Abe Y, Hashimoto S, Horie T: Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacol Res* 39(1):41–47, 1999

Aggarwal BB, Takada Y, Shishodia S, Gutierrez AM, Oommen OV, Ichikawa H, Baba Y, Kumar A, 2004. Nuclear transcription factor NF- κ B: role in biology and medicine. *Indian J. Exp. Biol.* 42, 341-353.

Anand P et al. (2007) Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol. Pharm.* 4, 807–818

Anand P, Sung B, Kunnumakkara AB, Rajasekharan KN, Aggarwal BB, 2011. Suppression of pro-inflammatory and proliferative pathways by diferuloylmethane (curcumin) and its analogues dibenzoylmethane, dibenzoylpropane, and dibenzylideneacetone: Role of Michael acceptors and Michael donors. *Biochem. Pharmacol.* 82, 1901-1909.

Barnes J, Anderson LA, Gibbons S, and Phillipson JD (2005) *J. Pharm. Pharmacol.* 57, 929 –954

Barton R. Efficacy of echinilin for the common cold. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 761 \pm 2.

Bennet D. Joints and joint diseases. Ed W. Whittick. Canine Orthopedics. Philadelphia, Lea & Febiger, Philadelphia, 1990 pp. :776-778.

Bharat B. Aggarwal and Bokyoung Sung. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends in Pharmacological Sciences* 2008, Vol.30 No.2

Bharti AC, Takada Y, Aggarwal BB, 2004. Curcumin (Diferuloylmethane) Inhibits Receptor Activator of NF-kB Ligand-Induced NF-kB Activation in Osteoclast Precursors and Suppresses Osteoclastogenesis. *J. Immunol.*, 172, 5940-5947

Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Speed, Bioinformatics* Vol. 19 no. 2 2003, pages 185-193.

Boraschi D, Dinarello CA. IL-18 in autoimmunity: review. *European. Cytokine Netw.*, 2006; 17,224-252.

Brasier AR, Lu M, Hai T, Lu Y, and Boldogh I. *J. Biol. Chem.* 2001; 276, 32080 –32093

Buhrmann C, Mobasheri A, Busch F, Aldinger C, Stahlmann R, Montaseiri A, Shakibaei M. Curcumin modulates nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-mediated inflammation in human tenocytes in vitro: role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J. Biol. Chem.* 2011; 286,28556-28566.

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000 Oct; 25(2):169-93.

Buttgereit F, Burmester GR, Simon LS. Gastrointestinal toxic side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2– specific inhibitors. *Am. J. Med.* 2001;110(3A): 13S–19S.

Carlson GP, Kaneko JJ. Isolation of leukocytes from bovine peripheral blood. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1973 Mar;142(3):853-6.

Cho ML, Jung YO, Moon YM, Min SY, Yoon CH, Lee SH, Park SH, Cho CS, Jue DM, Kim HY. Interleukin-18 induces the production of vascular endothelial growth factor (VEGF) in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via AP-1-dependent pathways. *Immunol. Lett.* 2005; 103,159-166.

Clemedson C, et al. 1996. MEIC evaluation of acute systemic toxicity: Part 1. Methodology of 68 in vitro toxicity assays used to test the first reference chemicals. *ATLA* 24, 251-272

Corthésy-Theulaz I, den Dunnen JT, Ferré P, Geurts JM, Müller M, van Belzen N, van Ommen B. Nutrigenomics: the impact of biomics technology on nutrition research. *Ann Nutr Metab.* 2005 Nov-Dec;49(6):355-65.

Creamer P, Hochberg MC, 1997. Osteoarthritis. *Lancet* 1997, 350, :503 - 508.

Csaki C, Mobasheri A, Shakibaei M. Synergistic chondroprotective effects of curcumin and resveratrol in human articular chondrocytes: inhibition of IL-1beta-induced NF-kappaB-mediated inflammation and apoptosis. *Arthritis Res. Ther.* 2009; 11,R165.

Facino RM, Carini M, Aldini G, Saibene L, Pietta P e Mauri P. Echinacoside and caffeoyl conjugates protect collagen from free radical-induced degradation:

A potential use of Echinacea extracts in the prevention of skin photodamage. *Planta Med* 61: 510–514, 1995.

Farinacci M, Colitti M, Sgorlon S, Stefanon B. Immunomodulatory activity of plant residues on ovine neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol.*; 2008; 126(1-2):54-63.

Farinacci M, Gaspardo B, Colitti M, Stefanon B, 2009a. Dietary administration of Curcumin modifies transcriptional of genes involved in inflammatory cascade in horse leukocytes. *Italian J. Anim. Sci. Atti del XVIII Congresso Nazionale A.S.P.A. Palermo, June 9-12, pp. 84-86.*

Farinacci M, Colitti M, Stefanon B, 2009b. Modulation of ovine neutrophil function and apoptosis by standardized extracts of Echinacea angustifolia, Butea frondosa and Curcuma longa. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128,366-373.

Felson DT, Zhang Y. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis and Rheumatism.* 1998, 41:, 1343-1355.

Fenech M, El-Sohemy A, Cahill L, Ferguson LR, French TA, Tai ES, Milner J, Koh WP, Xie L, Zucker M, Buckley M, Cosgrove L, Lockett T, Fung KY, Head R. Nutrigenetics and nutrigenomics: viewpoints on the current status and applications in nutrition research and practice. *J Nutrigenet Nutrigenomics.* 2011;4(2):69-89.

Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, 2002. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 39,237-246.

Franceschi C, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 908:244–54. [PubMed: 10911963]

Franz Ch, Bauer R, Carle R, Tedesco D, Tubaro A, Zitterl-Eglseer K. Assessment of plants/herbs, plant/herb extracts and their naturally or synthetically produced components as “additives” for use in animal production. CFT/EFSA/FEEDAP/2005/01.

Freund A, Orjalo AV, Desprez PY, Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med.* 2010 May;16(5):238-46. Epub 2010 May 3.

Fu WJ, Stromberg AJ, Viele K, Carroll RJ, Wu G. Statistics and bioinformatics in nutritional sciences: analysis of complex data in the era of systems biology. *J Nutr Biochem.* 2010 July ; 21(7): 561–572.

Funk JL, Oyarzo JN, Frye JB, Chen G, Lantz RC, Jolad SD, Sólyom AM, Timmermann BN. Turmeric extracts containing curcuminoids prevent experimental rheumatoid arthritis. *J Nat Prod.* 2006 Mar;69(3):351-5.

Getting SJ, Gibbs L, Clark AJ, Flower RJ, Perretti M. POMC gene-derived peptides activate melanocortin type 3 receptor on murine macrophages, suppress cytokine release, and inhibit neutrophil migration in acute experimental inflammation. *J Immunol.* 1999 Jun 15;162(12):7446-53.

Gillies PJ. Nutrigenomics: The Rubicon of molecular nutrition. *J Am Diet Assoc.* 2003 Dec;103(12 Suppl 2):S50-5.

Goel V, Lovlin R, Barton R, Lyon M R, Bauer R, Lee T D, and Basu T K (2004) *J. Clin. Pharmacol. Ther.* 29, 75– 83

Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:23-35.

Graisbauer M, Scheleich T, Stickl HA and Wilczek I, The effect of echinacea purpurea Moench on phagocytosis in granulocytes measured by chemiluminescence. (In German.) *Arzneimittelforschung* 40: 594 –598, 1990.

Grimble RF. Modification of inflammatory aspects of immune function by nutrients. *Nutrition Research*, Vol. 18, No. 7, pp. 1297-1317, 1998.

Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF- κ B. *Genes Dev* 2004; 18:2195-224.

Han Y, and Brasier AR. *J. Biol. Chem.* 1997; 272, 9823–9830

Heike L Pahl. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene* (1999) 18, 6853 \pm 6866

Henrotin Y, Kurz B. Antioxidant to treat osteoarthritis: dream or reality?. *Current. Drug Targets* 2007, 8:, 347—357.

Henrotin Y, Sanchez C, Balligand M. Pharmaceutical and nutraceutical management of canine osteoarthritis: Present and future perspectives. *The Veterinary Journal* 2005, 170:, 113-123.

Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med.* 2002 Mar-Apr;4(2):45-61

Immunologia Ivan Roitt, Jonathan Brostoff, David Male. Edizione Zanichelli 1998

Innes, J.F.,: 1995. Diagnosis and treatment of osteoarthritis in dogs. In *Practice* 1995, 17:, 102-109.

Innes JF, Fuller CJ, Grover ER, Kelly AL, Burn JF. Randomised, double-blind, placebocontrolled parallel group study of P54FP for the treatment of dogs with osteoarthritis. *Veterinary. Record.* 2003, 152:, 457-460.

Innes JF, Clayton J, Lascelles BD. Review of the safety and efficacy of long-term NSAID use in the treatment of canine osteoarthritis. *Vet Rec.* 2010; 166,226-230.

Ireson CR et al. (2002) Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11, 105–111

Izar MCO. Nutrigenomics and nutrigenetics. Future perspectives for disease prevention. *Int J Atheroscler* 2007; 2(3):203-206.

Jacob A, Wu R, Zhou M, Wang P. Source Mechanism of the Anti-inflammatory Effect of Curcumin: PPAR-gamma Activation. *PPAR Res.* 2007;2007:89369.

Jagetia GC and Aggarwal BB, 2007. *Journal of Clinical Immunology*, Vol. 27, No. 1, January 2007 “Spicing Up” of the Immune System by Curcumin

Joe B, Lokesh BR: Role of capsaicin, curcumin and dietary n – 3 fatty acids in lowering the generation of reactive oxygen species in rat peritoneal macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1224(2):255–263, 1994

Joe B, Lokesh BR: Dietary n – 3 fatty acids, curcumin and capsaicin lower the release of lysosomal enzymes and eicosanoids in rat peritoneal macrophages. *Mol Cell Biochem* 203(1–2):153–161, 2000

Jurenka JS. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Altern Med Rev.* 2009 Jun; 14(2):141-53.

Kaput J. Decoding the pyramid: a systems-biological approach to nutrigenomics. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Dec; 1055:64-79.

Kalra EK. Nutraceutical–definition and introduction. *AAPS PharmSci.* 2003;5(3):E25.

Kim GY, Kim KH, Lee SH, Yoon MS, Lee HJ, Moon DO, Lee CM, Ahn SC, Park YC, Park YM: Curcumin inhibits immunostimulatory function of dendritic cells: MAPKs and translocation of NF-kappa B as potential targets. *J Immunol* 174(12):8116–8124, 2005

Kligler B. Echinacea. *Am Fam Physician.* 2003 Jan 1;67(1):77-80.

Kopydlowski KM, Salkowski CA, Cody MJ, van Rooijen N, Major J, Hamilton TA, Vogel SN. Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo. *J Immunol.* 1999;163:1537-1544.

Li X, Liu X: Effect of curcumin on immune function of mice. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 25(2):137–140, 2005

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 2001 Dec; 25(4):402-8.

López-Armada MJ, Sánchez-Pernaute O, Largo R, Díez-Ortego I, Palacios I, Egido J, Herrero-Beaumont G. Modulation of cell recruitment by anti-

inflammatory agents in antigen-induced arthritis. *Ann. Rheumatic. Dis.* 2002; 61,1027-1030.

Lord PC, Wilmoth LM, Mizel SB, McCall CE. Expression of interleukin-1 alpha and beta genes by human blood polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest.* 1991;87:1312-1321.

Moon DO, Jin CY, Lee JD, Choi YH, Ahn SC, Lee CM, Jeong SC, Park YM, Kim GY: Curcumin decreases binding of Shiga-like toxin-1B on human intestinal epithelial cell line HT29 stimulated with TNF-alpha and IL-1beta: Suppression of p38, JNK and NF-kappaB p65 as potential targets. *Biol Pharm Bull* 29(7):1470-1475, 2006

Morazzoni P, Cristoni A, Di Pierro F, Avanzini C, Ravarino D, Stornello S, Zucca M, Musso T. In vitro and in vivo immune stimulating effects of a new standardized *Echinacea angustifolia* root extract (Polinacea). *Fitoterapia.* 2005 Jul; 76(5):401-11.

Muller-Jakic B, Breu W, Probstle A, Redl K, Greger H e Bauer R, In vitro inhibition of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase by alkamides from *Echinacea* and *Achillea* species. *Planta Med* 60: 37- 40, 1994

Mutch DM, Wahli W, Williamson G. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. *FASEB J.* 19, 1602-1616(2005)

Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 2002;420(6917):846-52.

Pan MH, Lin-Shiau SY, Lin JK. Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of IkappaB kinase and NFkappaB activation in macrophages. *Biochem Pharmacol.* 2000 Dec 1;60(11):1665-76.

Pellati F, Benvenuti S, Magro L, Melegari M and Soragni F; 2003, "Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of *Echinacea* spp". The journal of Pharmaceutical and biomedical analysis, Vol 35, issue 2, pp 289-301.

Perkins ND, Gilmore TD: Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death Differ* 2006, 13(5):759-772.

Perry GH, Dominy NJ, Claw KG, Lee AS, Fiegler H, Redon R, Werner J, Villanea FA, Mountain JL, Misra R, Carter NP, Lee C, Stone AC. Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. *Nat Genet.* 2007 Oct;39(10):1256-60.

Phillips HJ, Terryberry JE. Counting actively metabolizing tissue cultured cells. *Exp Cell Res.* 1957 Oct;13(2):341-7.

Quivy V, Van Lint C. Regulation at multiple levels of NF- κ B-mediated transactivation by protein acetylation. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 1221-9.

Raduner S, Majewska A, Chen JZ, Xie XQ, Hamon J, Faller B, Altmann KH, Gertsch J. Alkylamides from Echinacea are a new class of cannabinomimetics. Cannabinoid type 2 receptor-dependent and -independent immunomodulatory effects. *J Biol Chem.* 2006 May 19;281(20):14192-206. Epub 2006 Mar 17.

Randolph RK, Gellenbeck K, Stonebrook K, Brovelli E, Qian Y, Bankaitis-Davis D, and Cheronis J. (2003) *Exp. Biol. Med.* 228, 1051–1056

Riva A, Kohane IS. A SNP-centric database for the investigation of the human genome. *BMC Bioinformatics.* 2004 Mar 26;5:33

Roberts MA, Mutch DM, German JB. Genomics: food and nutrition. *Curr Opin Biotechnol.* 2001 Oct;12(5):516-22

Rockett JC, Burczynski ME. Introduction to surrogate tissue analysis. In: Burczynski M.E. and Rockett J.C. (eds), *Surrogate tissue analysis.* Taylor & Francis Group. 2006 pp.3-11.

Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J. Immunol.* 2003; 170,3233-3242.

Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, Liang W, Sharov V, Howe EA, Li J, Thiagarajan M, White JA, Quackenbush J. TM4 microarray software suite. *Method Enzymol.* 2006; 411,134-193.

Salminen A, Huuskonen J, Ojala J, Kauppinen A, Kaarniranta K, Suuronen T. Activation of innate immunity system during aging: NF- κ B signaling is the molecular culprit of inflammaging. *Ageing Res Rev* 2008; 7: 83-105.

Sandur SK et al. (2007) Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. *Carcinogenesis* 28, 1765–1773

Sarkar D, Fisher PB. Molecular mechanisms of aging-associated inflammation. *Cancer Lett* 2006;236 (1):13–23.

Sartorelli P, Paltrinieri S, Comazzi S. Non-specific immunity and ketone bodies. II: In vitro studies on adherence and superoxide anion production in ovine neutrophils. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2000 Feb;47(1):1-8.

Scriver R, Vasile M, Bartosiewicz I, Valesini G. Inflammation as a common soil of the multifactorial diseases. *Autoimmunity Reviews* 10(2011) 369-374

Semalty A, Semalty M, Rawat MS, Franceschi F. Supramolecular phospholipids-polyphenolics interactions: the PHYTOSOME strategy to improve the bioavailability of phytochemicals. *Fitoterapia.* 2010 Jul;81(5):306-14. Epub 2009 Nov 14.

Sen R and Baltimore D. (1986a). *Cell*, 47, 921 \pm 928.

Shakibaei M, John T, Schulze-Tanzil G, Lehmann I, Mobasheri A. Suppression of NF- κ B activation by curcumin leads to inhibition of expression of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular chondrocytes: Implications for the treatment of osteoarthritis. *Biochemical. Pharmacology*. 2007, 73,:1434-1445.

Sharif O, Bolshakov V, Raines S, Newham P, Perkins ND. Transcriptional profiling of the LPS induced NF- κ B response in macrophages. *BMC Immunol*. 2007; 8: 1.

Schulze-Osthoff K, Beyaert R, Van Dervoorde V, Haegeman G, and Fiers W. (1993) *EMBO J*. 12, 3095–3104.

Siddiqui AM, Cui X, Wu R, Dong W, Zhou M, Hu M, Simms HH, Wang P: The anti-inflammatory effect of curcumin in an experimental model of sepsis is mediated by up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Crit Care Med* 34(7):1874–1882, 2006

Sikora E, Bielak-Zmijewska A, Mosieniak G, Piwocka K: The promise of slow down ageing may come from curcumin. *Current Pharmacological Design* 2010.

Sikora et al., Curcumin, inflammation, ageing and age-related diseases. *Immunity and Ageing* 2010, 7:1

Singh S, Aggarwal BB: Activation of transcription factor NF- κ B is suppressed by curcumin (diferulolymethane). *J Biol Chem* 270(42):24995–25000, 1995

Sreejayan N, Rao MNA. Free radical scavenging by curcuminoids. *Arzneimittelforschung Arzneimittel Forschung - Drug Research* 1996, 46:, 169—171.

Sreejayan N, Rao MNA. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1997, 49, :105—107.

Steinmuller C, Roesler J, Grottrup E, Franke G, Wagner H e Lohmann-Matthes M-L, Polysaccharides isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea* enhance the resistance of immunosuppressed mice against systemic infections with *Candida albicans* and *Listeria monocytogenes*. *Int J Immunopharmacol* 15: 605– 614, 1993

Stimpel M, Proksch A, Wagner H and Lohmann-Matthes M-L, Macrophage activation and induction of macrophage cytotoxicity by purified polysaccharide fractions from the plant *Echinacea purpurea*. *Infect Immun* 46: 845– 849, 1984

Taiz L, Zeiger E. *Fisiologia vegetale*. Edizione Piccin. 2001

Theilgaard-Mönch K, Porse BT, Borregaard N. Systems biology of neutrophil differentiation and immune response. *Curr Opin Immunol*. 2006 Feb;18(1):54-60.

Tian B, Nowak DE, Jamaluddin M, Wang S, and Brasier AR. Identification of Direct Genomic Targets Downstream of the Nuclear Factor- κ B Transcription Factor Mediating Tumor Necrosis Factor Signaling. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 280, No. 17, Issue of April 29, pp. 17435–17448, 2005

Tung JP, Fraser JF, Wood P, Fung YL. Respiratory burst function of ovine neutrophils. BMC Immunol. 2009 May 8;10:25.

Tweedie D, Luo W, Short RG, Brossi A, Holloway HW, Li Y, Yu QS, Greig NH. A cellular model of inflammation for identifying TNF-alpha synthesis inhibitors. J Neurosci Methods. 2009 Oct 15;183(2):182-7.

Vane J, Botting R, 1996. Mechanisms of action of anti-inflammatory drugs. In: J. Vane, J. Botting, R. Botting (Eds.), Improved Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: COX-2 Enzyme Inhibitors. Eds J. Vane, J. Botting, R. Botting. Dordrecht, Kluwer Academic: pp. 1-27.

Vasto S, et al. Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. Mech Ageing Dev 2007;128(1):83–91. [PubMed: 17118425]

Youn HS, Saitoh SI, Miyake K, Hwang DH. Inhibition of homodimerization of Toll-like receptor 4 by curcumin. Biochem. Pharmacol. 2006; 72,62-69.

Wagner H, Stuppner H, Schafer W and Zenk M, Immunologically active polysaccharides of Echinacea purpurea cell cultures. Phytochemistry 27: 119–126, 1988

Wells DJ. Animal welfare and the 3Rs in European biomedical research. Ann N Y Acad Sci. 2011 Dec;1245:14-6.

Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. Lab Invest. 2000 May; 80(5):617-53.

Zingarelli B, Sheehan M, Hake PW, O'Connor M, Denenberg A, Cook JA. Peroxisome proliferator activator receptor-gamma ligands, 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 and ciglitazone, reduce systemic inflammation in polymicrobial sepsis by modulation of signal transduction pathways. Journal of Immunology. 2003;171(12):6827–6837.

<http://www.tm4.org/mev/>